



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Off nlegungsschrift
⑩ DE 199 63 612 A 1

⑤ Int. Cl.7:
C 07 K 14/435
C 07 K 16/18
A 61 K 38/17
A 61 K 39/395

314

DE 199 63 612 A 1

②1 Aktenzeichen: 199 63 612.5
②2 Anmeldetag: 29. 12. 1999
④3 Offenlegungstag: 12. 7. 2001

⑦1 Anmelder:
Forschungsgesellschaft GENION m.b.H, 20149
Hamburg, DE

⑦4 Vertreter:
Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg

⑦2 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

⑤6 Entgegenhaltungen:
Kong, W., Po, S., Yamagishi, T., [u.a.]: Isolation
and characterization of the human gene encoding
I_{to}: further diversity by alternative mRNA
splicing. In: AJP-Heart and Circulatory Physio-
logy. 1998, Vol. 275, Issue 6, H1963-H1970;
Dilks, D., Ling, H., Cockett, M., [u.a.]: Cloning
and expression of the human Kv4.3 potassium
chann-
el. In: The Journal of Neurophysiology. 1999,
Vol. 81, No. 4, S. 1974-1977;
Internet site: accession number 3AA96454;
Internet site: accession number AAD22053;
Internet site: accession number AAC05122;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Neue spannungsabhängige Kaliumkanäle aus der Kv4-Familie sowie deren Verwendung zur Entwicklung von
Therapeutika

⑤7 Gegenstand der Erfindung sind neue Untereinheiten
humaner spannungsabhängiger Kaliumkanäle, insbeson-
dere hKv4.1 und hKv4.2. Ferner werden im Rahmen der
Erfindung Vektoren zur Verfügung gestellt, die hKv4.1
bzw. hKv4.2 enthalten, sowie diese Vektoren enthaltende
Wirtszellen, die die Kaliumkanaluntereinheiten bzw. die
Kaliumkanaluntereinheiten enthaltenden Kaliumkanäle
exprimieren. Gegenstand der Erfindung sind ferner ge-
gen die Kaliumkanaluntereinheiten gerichtete Antikörper.
Ferner wird ein Verfahren zum Identifizieren von Substan-
zen zur Verfügung gestellt, die Kv4.1 bzw. Kv4.2-Kalium-
kanäle öffnen, schließen, aktivieren, inaktivieren oder in
ihren biophysikalischen Eigenschaften verändern kön-
nen. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Er-
findung dient das Verfahren zur Spezifikation von Antiarr-
hythmika bzw. zum Auffinden und Identifizieren von Thera-
peutika zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankun-
gen, zur Verbesserung des Lernvermögens und von Ge-
dächtnisleistungen und zur Behandlung neurodegenera-
tiver Erkrankungen.

DE 199 63 612 A 1

Gegenstand der Erfindung sind zwei neue Untereinheiten humaner spannungsabhängiger Kaliumkanäle, insbesondere hKv4.1 und hKv4.2. Ferner werden im Rahmen der Erfindung Vektoren zur Verfügung gestellt, die hKv4.1 bzw. hKv4.2 enthalten, sowie diese Vektoren enthaltende Wirtszellen, die die Kaliumkanaluntereinheiten bzw. die Kaliumkanaluntereinheiten enthaltenden Kaliumkanäle exprimieren. Gegenstand der Erfindung sind ferner gegen die Kaliumkanaluntereinheiten gerichtete Antikörper. Ferner wird ein Verfahren zum Identifizieren von Substanzen zur Verfügung gestellt, die Kv4.1 bzw. Kv4.2-Kaliumkanäle öffnen, schließen, aktivieren, inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften verändern können. Gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung dient das Verfahren zur Spezifikation von Antiarrhythmika bzw. zum Auffinden und Identifizieren von Therapeutika zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, zur Verbesserung des Lernvermögens und von Gedächtnisleistungen und zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

Die Membranen von Säugetierzellen sind für die strukturelle Integrität und die Aktivität von Zellen und Gewebe von großer Bedeutung. Eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen wird von membrandurchspannenden Ionenkanälen gesteuert. In der Vergangenheit konnten verschiedene Ionenkanäle identifiziert werden, durch die Kalzium, Natrium und/oder Kalium die Zellmembran passieren können.

Die Aktivität von Kaliumkanälen kann entweder durch intrazelluläre Signalstoffe wie cAMP oder durch Potentialdifferenzen an der Zellmembran reguliert werden. Diese Potentialdifferenzen oder Spannungen kommen durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle zustande.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind in Abhängigkeit des über die Zellmembran vorliegenden Potentials geöffnet oder geschlossen. Es sind verschiedene Klassen von spannungsabhängigen Kaliumkanälen bekannt, deren Aufbau in der Regel ähnlich ist. Grundsätzlich bestehen sie aus vier homologen α -Untereinheiten. Die α -Untereinheiten gehören zu einer gemeinsamen Gensuperfamilie. Sie besitzen eine vergleichbare zweidimensionale Struktur, aus der eine für Kaliumkanäle typische Membrantopologie hervorgeht (O. Pongs, *Physiol. Rev.* 72 (1992) S. 69–88; L. Y. Jan et al., *Nature* 371 (1994) 119–122; K. G. Chandy et al., in *Handbook of Receptors and Channels* ed. R. A. North, Boca Raton 1 (1994) 1–71; O. Pongs, *FEBS Lett.* 452 (1999) 31–35). Jede α -Untereinheit besitzt sechs hydrophobe Membran-durchspannende Segmente S1–S6. Zwischen S5 und S6 liegt die sogenannte P-Region, die von der extrazellulären Seite in die Membran eintaucht. Die P-Region hat einen entscheidenden Anteil an der Ausbildung der Kaliumkanalpore. Das S4-Segment enthält mehrere Aminosäuren mit positiven Ladungen, die wahrscheinlich für die Spannungsempfindlichkeit des Kanals einen wesentlichen Beitrag liefern. Zusätzlich können spannungsabhängige Kaliumkanäle auch β -Untereinheiten enthalten. Die β -Untereinheiten sind für die Regulation der Aktivität des Kanals von Bedeutung, während die α -Untereinheiten den eigentlichen funktionellen Kaliumkanal bilden (O. Pongs, *Biospektrum* 3 (1997) 21–26).

Die Familie der spannungsabhängigen Kaliumkanaluntereinheiten läßt sich in mehrere Unterfamilien unterteilen, von denen die Kv1- bis Kv4-Familien gut charakterisiert sind (W. Stühmer et al., *EMBO J.* 8 (1989) 3235–3244; B. Albrecht et al., *Receptor and Channel* 1 (1993) 99–199; J. Rettig et al., *EMBO J.* 11 (1992) 2473–2486; Serodio et al., *J. Neurophysiol.* 75 (1996) 2174–2179). Innerhalb der Unterfamilien liegt die Sequenzidentität der einzelnen α -Untereinheiten untereinander auf der Ebene der Aminosäuren bei $\geq 60\%$. Die bisher klonierten α -Untereinheiten der Familien Kv1 bis Kv4 exprimieren funktionelle Kaliumkanäle in heterologen Expressionssystemen, d. h. nach Injektion von DNA und mRNA in *Xenopus* Oozyten bzw. in Gewebekulturzellen (z. B. Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, Human Epithelial Kidney (HEK) 293 Zellen) oder nach Transfektion von Gewebekulturzellen mit für α -Untereinheiten kodierender DNA in geeigneten Expressionsvektoren wie pcDNA3 (s. u.).

Zusätzlich zu α -Untereinheiten von Kv1 bis Kv4 sind noch weitere potentielle Kv α -Untereinheiten bekannt (M. A. Post et al., *FEBS* 399 (1996) 177–182; J. P. Hugnot et al., *EMBO* 15 (1996) 3322–3331; A. Castellano et al., *J. Neurosci.* 17 (1997) 4652–4661; J. A. Drewe et al., *J. Neurosci.* 12 (1992) 538–548), die zu Kv1 bis Kv4 bezogen auf die Aminosäuren eine Sequenzidentität von $< 60\%$ zeigen. Diese Kanäle wurden als Kv5.1, Kv6.1, Kv7.1, Kv8.1 bezeichnet. Hauptmerkmal dieser α -Untereinheiten ist, daß sie zwar für Kaliumkanal α -Untereinheiten typische Sequenzmerkmale enthalten, aber als Homomultimere keine funktionellen Kanäle in heterologen Expressionssystem ausbilden.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle können vielfältige physiologische Aufgaben übernehmen, die von der Regulation des Membranruhepotentials bis hin zur Regulation der Exozytose und Zellproliferation reichen. In erregbaren Zellen haben spannungsabhängige Kaliumkanäle eine wichtige Bedeutung für die Repolarisation der Aktionspotentiale und die Regulation des Schwellenwertes, von dem aus ein Aktionspotential ausgelöst werden kann. Insofern steuert die Aktivität von Kaliumkanälen sowohl die Dauer und Verlaufsform des Aktionspotentials als auch die Aktionspotentialauslösungsfrequenz. Dies gilt auch für die rhythmische Erzeugung von Aktionspotentialen im Herzmuskelgewebe, dem Myocard (R. E. Ten Eick et al., *FASEB J.* 6 (1992) 2568–2580).

Mehrere distinkte Kaliumkanaltypen sind an der Generierung und Repolarisierung der Aktionspotentiale im Myocard beteiligt. An der Repolarisierung sind Kv-Kanäle beteiligt, die insbesondere die Ströme I_{to} , I_{KR} und I_{SK} vermitteln. I_{to} ist ein schnell aktivierender transienter Kaliumauswärtsstrom, I_{KR} ist ein schnell aktivierender, nicht-inaktivierender Kaliumauswärtsstrom, I_{SK} ist ein langsam aktivierender Kaliumauswärtsstrom. Diese Ströme wurden an dissoziierten, in Kultur gehaltenen Myocardzellen gemessen (R. C. Kass und L. C. Freeman, *Trends Cardiovasc. Med.* 3 (1993) 149–159; D. M. Barry und J. M. Nerbonne, *Ann. Rev. Physiol.* 58 (1996) 363–394). Die Analyse von erblichen Herzrhythmusstörungen, die zu einem langen QT-Syndrom, d. h. einer verzögerten Repolarisierung des kardialen Aktionspotentials, führen, hat gezeigt, daß der I_{SK} -Strom im wesentlichen durch die Kv-Kanäle KCNQ1/KCNE1 vermittelt wird (M. C. Sanguinetti et al., *Nature* 384 (1996) 80–83; J. Berhanin et al., *Nature* 384 (1996) 78–80; C. Chouabe et al., *EMBO J.* 16 (1997) 5472–5479). Der I_{KR} -Strom wird durch die Kv-Kanäle KCNH2/KCNE2 Kv-Kanäle vermittelt, die zur Nachhyperpolarisierung und damit zur Stabilisierung des Schwellenwertes beitragen (P. L. Smith et al., *Nature* 379 (1996) 833–836; 1998; G. W. Abbott et al., *Cell* 97 (1999) 175–187).

Pharmakologisch ist es möglich, KCNN1/KCNE2 Kanäle relativ spezifisch durch Pharmaka wie E-4031 zu blockieren (P. S. Spector et al., *Circ Res.* 78 (1996) 499–503).

In Nagem sind Kanäle des hier beschriebenen Typus, Kv4.2, an der Ausbildung des I_{to} beteiligt (D. C. Johns et al., J. Biological. Chem. 272 (1997) 31 598–31 603; D. M. Barry et al., Circ. Res. 83 (1998); T. Y. Nakamura et al., Am. J. Physiol. 273 (1997) 1775–1786). Für das humane Herz wird hingegen angenommen, daß Kv-Kanäle des Typus Kv4.3 (W. Kong et al., Am. J. Physiol. 275 (1998) H1963–H1970) zum I_{to} vermitteln (Kääh et al., Circ. Res. 98 (1998) 1383–1393) während Kv4.2 keine wesentliche Rolle zu spielen scheint (J. E. Dixon et al., Circ. Res. 79 (1996) 659–668; diese Schrift).

Herzrhythmusstörungen werden gegenwärtig häufig mit Ionenkanalblockern behandelt. Die Wirkungsweise dieser Blocker läßt sich dahingehend klassifizieren, ob sie die Depolarisierungsgeschwindigkeit (Anstieg) des kardiakalen Aktionspotentials verzögern (z. B. Flecainid, Phenytoin) bzw. die Dauer des kardiakalen Aktionspotentials verlängern (z. B. Sotalol, Aminodaron, Chinidin, Disopyramid) (T. J. Colatsky in Potassium Channel Modulators (Herausgeber A. H. Weston and T. C. Hamilton) (1992) Blackwell Scientific Publ.; Oxford; pp. 304–340).

Bei der Behandlung von Herzrhythmusstörungen spielen Antiarrhythmika klinisch eine wichtige Rolle. Die Klassifizierung der Antiarrhythmika erfolgt in vier Klassen, wobei zu Klasse I z. B. Flecainid und Chinidin gezählt werden. Diese Substanzen blockieren zum einen den Natriumkanal und verzögern damit den Anstieg des Aktionspotentials, zum anderen wirken sie aber auch auf Kaliumkanäle, insbesondere solche die an der Ausbildung des I_{to} beteiligt sind.

Die Verabreichung von Antiarrhythmika ist häufig mit erheblichen Nachteilen für den Patienten verbunden, die sich bei den Patienten im Auftreten von Kopfschmerzen, Schwindel, Augenflimmern oder Magen-Darmstörungen manifestieren können (J. Braun und R. Preuss. Klinikleitfaden Intensivmedizin, 2. Auflage, Jung Johann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm/Stuttgart (1992)). Bei älteren Patienten kommen häufig hypotone Kreislaufstörungen vor. Bei stark vorgeschädigtem Myokard könne unerwünschte Beeinträchtigungen der Erregungsleitung im HIS-Purkinje-System und der Myokardkontraktilität auftreten (P. Vigneux et al., Therapie 50 (1995) 413–418; P. J. Podrid und J. L. Anderson, Am. J. Cardiol. 15 (1996) 430–434; E. Aliot und I. Denjoy, Am. J. Cardiol. 77 (1996) 66A–71A).

Aufgrund der Nebenwirkungen von Flecainid und anderen im Stand der Technik bekannten Antiarrhythmika wird ständig nach neuen Wirkstoffen gesucht. Das gezielte Screening nach neuen Antiarrhythmika erfolgt in der Pharma-Industrie bislang in der Regel mit Hilfe relativ aufwendiger Organ- bzw. Gewebepreparate. Dabei wird z. B. die Funktion eines isolierten Kaninchenherzens unter entweder einem konstanten Druck oder einem konstanten Fluß gemessen (A. von Bethmann et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153 (1996) A529).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein neues Testsystem (Assay) zur Verfügung zu stellen, das geeignet ist, Stoffe auf ihre Eignung als Antiarrhythmika zu testen, d. h. mit dem getestet werden kann, ob Wirkstoffe spezifisch die für I_{to} -Ströme verantwortlichen Kanäle beeinflussen. Mit dem Testsystem sollen Pharmaka somit auf ihre Wirkung gegenüber I_{to} -Strömen überprüft werden können. Insbesondere soll das Testsystem geeignet sein, Wirkstoffe zu identifizieren, die wenig oder gar nicht mit den Kanälen interagieren, die I_{to} -Ströme leiten und somit die bei den bislang bekannten Antiarrhythmika beobachteten Nebenwirkungen nicht aufweisen. Ferner liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Assay zur Verfügung zu stellen, der den bislang notwendigen Einsatz von Organkulturen überflüssig macht oder zumindest stark einschränkt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch Wirtszellen gelöst, die den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv4.1, Kv4.1/Kv4.2, Kv4.1/Kv4.3, Kv4.2, Kv4.2/Kv4.3, Kv4.1/4.2/4.3 oder Kv4.3 exprimieren, d. h. einen Kaliumkanal, der aus vier Untereinheiten besteht, wobei die Untereinheiten aus der Gruppe bestehend aus Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3 ausgewählt sind.

Gemäß der hier gewählten Terminologie handelt es sich bei dem mit "Kv4.1" bezeichneten Kaliumkanal somit um ein Homotetramer bestehend aus vier Kv4.1-Kaliumkanaluntereinheiten. Mit "Kv4.1/Kv4.2" wird beispielsweise ein Kaliumkanal bezeichnet, der aus den Untereinheiten Kv4.1 und Kv4.2 besteht, die ein Heterotetramer bilden, wobei alle denkbaren stöchiometrischen Verhältnisse (d. h. 1 : 3, 2 : 2, 3 : 1; bei 0 : 4 oder 4 : 0 handelt es sich um ein Homotetramer) eingeschlossen sind. "hKv4" bezeichnet einen Kv4-Kanal humanen Ursprungs. Soweit im folgenden "Kv4" verwendet wird, umfaßt dieser Begriff alle zur Kv4-Familie zählenden Untereinheiten, wie z. B. Kv4.1, Kv4.2, Kv4.3.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschenderweise festgestellt, daß die bislang nicht klonierte humane Kaliumkanaluntereinheit Kv4.2 sehr spezifisch im zentralen Nervensystem (ZNS), im Gegensatz zu Nagem (Zhn X. R. Receptor Channels 6 (1999) 387–400) aber kaum im Myokard exprimiert wird (siehe Beispiel 3). Unerwartet war auch der Befund, daß die bislang nicht klonierte Untereinheit Kv4.1 in vielen Geweben und auch im humanen Myokard exprimiert wird. Es ist daher davon auszugehen, daß die meisten Kv4-Kanäle Kv4.1 als Untereinheit enthalten. In Northern blots von mRNA extrahiert aus verschiedenen humanen Geweben wurde Kv4.2 mRNA nur im Gehirn, Kv4.1 und Kv4.3 mRNA hingegen sowohl im Gehirn als auch in Herz, Lunge, Placenta, Leber, Niere, Pankreas und Skelettmuskel nachgewiesen (Beispiel 3).

Durch diese Erkenntnis ist somit die Entwicklung von Assays möglich, mit deren Hilfe sich die Organspezifität (Herz oder ZNS) von Substanzen, die auf Kaliumkanäle der Kv4-Unterfamilie wirken, bestimmen läßt. Dies ist von großer Bedeutung, da sich auf diese Weise z. B. Antiarrhythmika entwickeln lassen, die die Blut-Hirn-Schranke zwar passieren können, jedoch keine Wirkung auf den ZNS-spezifischen Kaliumkanal Kv4.2 ausüben. Es ist zu erwarten, daß derartige Wirkstoffe die mit herkömmlichen Antiarrhythmika assoziierten Nebenwirkungen wie Kopfschmerz, Schwindel oder Augenflimmern nicht aufweisen sollten, so diese Nebenwirkungen durch Interaktion mit Kv4.2-Kanälen verursacht werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß die erfindungsgemäßen (funktionellen) Kv4.1- und Kv4.2-Kanäle hochsensitiv gegen das Klasse I Herzantiarrhythmikum Flecainid sind, d. h. einen hochaffinen Rezeptor für das Klasse I Antiarrhythmikum Flecainid darstellen. Dies könnte ein Grund für die o. g. Nebenwirkungen von Antiarrhythmika im allgemeinen und von Flecainid im besonderen sein.

Kv4.1- und Kv4.3-Untereinheiten vermitteln transiente schnellinaktivierende Kaliumauswärtsströme, die aufgrund ihrer Eigenschaften zu I_{to} -Strömen beitragen können. Aufgrund des Vorkommens der humanen Kv4.1-, Kv4.2- und Kv4.3-Untereinheiten im humanen ZNS und der gefundenen Eigenschaften der vermittelten Auswärtströme können Kv4.1-, Kv4.2- und Kv4.3-Kanäle bzw. Kanäle, die Kv4.1-, Kv4.2- und/oder Kv4.3-Untereinheiten (d. h. sowohl Homo- als

auch Heterotetramere) enthalten, somatodendritische Kaliumkanäle bilden, die einen transienten schnell-inaktivierenden, sog. A-Typ Kaliumauswärtsstrom in Dendriten und im Soma eines Neurons vermitteln. Von diesen Strömen ist bekannt, daß sie einen wichtigen Beitrag zur Erzeugung, Integration und Weiterleitung dendritischer Aktionspotentiale leisten (D. A. Hoffmann und D. Johnston, *J. Neurosci.* 18 (1998) 3521–3528). Diesem Prozeß wird eine wesentliche Bedeutung bei Lern- und Gedächtnisvorgängen beigemessen, die im Zusammenhang mit Langzeitpotenzierungen synaptischer Übertragungen stehen (D. A. Hoffmann et al., *Nature* 387 (1997) 869–875). Im neuronalen Bereich spielen Kaliumkanäle somit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität von Neuronen. Modulatoren dieser Kaliumkanäle können daher potentiell nicht nur Lern- und Gedächtnisfunktionen beeinflussen, sondern – aufgrund des hohen Vorkommens der Kv4.2 Kaliumkanaluntereinheit in humaner striataler Cortex und in humaner Substantia nigra beispielsweise auch bei (neurodegenerativen) Erkrankungen des Nervensystems (z. B. Autismus, Epilepsien, Ischämien, Schlaganfall, Morbus Parkinson, Morbus Huntington und Alzheimer'sche Erkrankung) therapeutisch eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle eignen sich somit nicht nur in besonderer Weise zur gezielten Identifizierung und Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sondern auch des Nervensystems in Mensch und Tier, insbesondere von Antineurodegenerativa. Kv4.1 und Kv4.3 homotetramere bzw. Kv4.1/Kv4.3 heterotetramere Kaliumkanäle werden im Herzen exprimiert, nicht aber Kv4.2 homotetramere bzw. Kv4.1/Kv4.2, Kv4.2/Kv4.3, Kv4.1/Kv4.2/Kv4.3 heterotetramere Kanäle. Diese sind besonders geeignet zur Suche nach spezifischen Wirkstoffen zur Behandlung von Erkrankungen des Nervensystems (s. o.).

Erfindungsgemäß werden daher neue humane Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.1 und Kv4.2 zur Verfügung gestellt, die die in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 4 gezeigten Aminosäuresequenzen aufweisen. Die Untereinheit Kv4.3 weist die in SEQ ID NO: 29 dargestellte Sequenz auf. [Die Angabe "SEQ ID NO:" entspricht der numerischen Kennzahl "<400>" im Sequenzprotokoll. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind auch Homologe mit mindestens 70% Sequenzidentität sowie Derivate, z. B. phosphorylierte Untereinheiten und durch Mutagenese veränderte Untereinheiten, oder Fragmente der Kaliumkanalproteine, die die gleiche elektrophysiologische, pharmakologische und biologische Wirksamkeit und/oder Immunogenität aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Kaliumkanalproteine (Untereinheiten) sowie Homologe, Derivate oder Fragmente derselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität sind auf verschiedenen, dem Fachmann bekannten Wegen erhältlich. Zum einen können Kaliumkanalproteine oder Homologe, Derivate oder Fragmente derselben mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Desweiteren können Antikörper gegen Fragmente der Polypeptide nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden (E. Harlow und D. Lane, *Antibodies: A Laboratory manual* (1988) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Mittels dieser Antikörper kann dann das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder Derivate und Fragmente desselben aus Zellen isoliert werden, die natürlicherweise das Kaliumkanalprotein exprimieren, es ist aber ebenso denkbar, daß Zellen verwendet werden, in die für das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein kodierende Nukleinsäuresequenzen eingeführt werden und die das Protein anschließend unter geeigneten Bedingungen exprimieren.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Kaliumkanal, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er mindestens die Kaliumkanaluntereinheit Kv4.1 enthält. Erfindungsgemäß kann der Kaliumkanal neben der Untereinheit Kv4.1 auch andere Kaliumkanaluntereinheiten enthalten. Dabei kommen besonders die Untereinheiten Kv4.2 und Kv4.3 in Frage sowie Homologe, Derivate z. B. phosphorylierte Untereinheiten und durch Mutagenese veränderte Untereinheiten oder Fragmente derselben, die die gleiche elektrophysiologische, pharmakologische und/oder biologische Wirkung und/oder Immunogenität aufweisen. Besonders bevorzugt enthält er zusätzlich die Kaliumkanaluntereinheit Kv4.3. Wie bereits oben erwähnt, können diese Kaliumkanäle in Form von Homo- oder Heterotetrameren vorliegen, wobei die Kanäle Kv4.1, Kv4.1/Kv4.2, und Kv4.1/Kv4.3.

Die spezifischen Inaktivierungseigenschaften des Kaliumkanals hängen von den Kaliumkanaluntereinheiten ab, die er neben Kv4.1 enthält. Enthält er neben Kv4.1 eine andere Kaliumkanaluntereinheit, so handelt es sich um einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, der bei Depolarisierung der Membran Auswärtsströme vermittelt, die gleich, schneller oder langsamer inaktivieren als die vom Vergleichskanal Kv4.1 vermittelten Ströme.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Nukleinsäuresequenzen, die für die erfindungsgemäßen Kaliumkanalproteine bzw. Kaliumkanäle, deren Homologe, Derivate und/oder Fragmente mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und Immunogenität kodieren. Besonders bevorzugt können diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ausgewählt werden aus:

- (a) der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz,
- (b) der in SEQ ID NO: 2 angegebenen Nukleotidsequenz,
- (c) syngenen oder komplementären Sequenzen der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 (soweit sie für Protein und Polypeptide mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren) und
- (d) allelischen Varianten und Fragmenten der unter (a) bis (c) genannten Sequenzen (soweit sie für Protein und Polypeptide mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren).

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Vektor, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er eines oder mehrere der oben genannten Nukleinsäuresequenzen enthält. Geeignete Vektoren sind pBluescript KS+ und pBluescript KS (Stratagene, La Jolla, CA, US), sind aber nicht auf diese beschränkt. Vorzugsweise ist der Vektor ein Expressionsvektor, wie z. B. pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US), wobei die Erfindung aber nicht auf diesen beschränkt ist.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können in diese Vektoren nach allgemeinen bekannten Methoden kloniert werden (T. Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, US). Erfindungsgemäß enthalten die Expressionsvektoren Kontrollelemente für Transkription, Transkriptionsstart, Transkriptionsende, mRNA-Prozessierung und Translation, die in den erfindungsgemäß verwendeten

ten Expressionssystemen in aktiver Form vorliegen.

Vorzugsweise enthalten die Vektoren Sequenzen, die die Replikation der oben genannten Nukleinsäuremoleküle erleichtern. Besonders bevorzugt enthalten sie ferner Sequenzen, die die Integration der Nukleinsäuresequenzen in das Genom einer Wirtszelle erleichtern.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung entsprechen die Vektoren den am 23. 12. 1999 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland, in Form transformierter *E. coli*-Stämme nach dem Budapestervertrag hinterlegten Vektoren mit den Zugriffsnummern DSM 13 222 und DSM 13 221, die eine für hKv4.1 (im Vektor pcDNA3; DSM 13 222) bzw. hKv4.2 (im Vektor pGEM HE; DSM 13221) kodierende Nukleinsäuresequenz enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ferner Wirtszellen, die mit den genannten Vektoren, die für eine Kaliumkanaluntereinheit kodieren (vorzugsweise Kv4.1 oder Kv4.2), transformiert sind. Besonders bevorzugt sind diese Wirtszellen CHO-Zellen oder *Xenopus* Oozyten, es kommen aber auch andere Eukaryontenzellen aus der Gruppe bestehend aus COS, HEK 293, NIH-3T3 in Frage, die Erfindung ist aber nicht auf diese Zellen beschränkt. Von Bedeutung ist, daß die Promotor- und/oder Enhancersequenzen auf die mit den Vektoren transformierten Wirtszellen abgestimmt sind. Dadurch kann eine erhöhte Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide sichergestellt werden.

Ferner ist eine Wirtszelle Gegenstand dieser Erfindung, die zusätzlich zu einem der oben genannten Vektoren mit mindestens einem weiteren Vektor transformiert ist, der vorzugsweise eine abweichende Nukleinsäuresequenz enthält, d. h. eine Sequenz, die z. B. für eine andere Kaliumkanaluntereinheit aus der Gruppe bestehend aus Kv4.1, Kv4.2 und Kv4.3 kodiert. Gemäß einer besonderen Ausführungsform enthält die Wirtszelle Vektoren, die entweder für die Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.1 und Kv4.2 oder für die Untereinheiten Kv4.1 und Kv4.3 oder die für Homologe, Derivate oder Fragmente derselben kodieren. Ferner kommen auch oligo-/multicistronische Expressionssysteme in Frage.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere eine Wirtszelle, die einen funktionellen Kaliumkanal exprimiert, der Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.1, und/oder Kv4.2 (entweder als Homo- oder Heterotetramer und gegebenenfalls zusammen mit Kv4.3) enthält. Vorzugsweise exprimiert die Wirtszelle den funktionellen Kaliumkanal auf ihrer Oberfläche, es ist aber ebenso möglich, daß der funktionelle Kaliumkanal in intrazellulären Membranen exprimiert wird.

Erfindungsgemäß eingeschlossen ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, die von den erfindungsgemäßen Wirtszellen exprimierten Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren und/oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

- (a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- (b) die Wirtszellen mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und
- (c) an den Wirtszellen erneut den Kaliumauswärtsstrom mißt,

wobei der Unterschied zwischen den Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die hinzuzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung der Kaliumauswärtsströme zu erreichen.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als öffnende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz keine Kaliumauswärtsstrom fließen, Kaliumauswärtsströme fließen.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine aktivierende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine inaktivierende Substanz bezeichnet, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom vermindert wird, ohne daß der Kaliumauswärtsstrom vollständig zum Erliegen kommt.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz als eine verändernde Substanz bezeichnet, wenn durch Zugabe der Substanz biophysikalische Eigenschaften des Kaliumkanals wie Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeit, Aktivierungszeitkonstanten, Inaktivierungszeitkonstanten, Schaltverhalten, Offenzeiten oder Geschlossenzeiten verändert werden.

Erfindungsgemäß wird eine Substanz auch dann als eine verändernde Substanz bezeichnet, wenn durch Zugabe der Substanz die Zelloberflächenexpression des Kaliumkanals verändert wird. Eine Veränderung der Zelloberflächenexpression führt zu einer Zunahme bzw. Abnahme der zu messenden Kaliumauswärtsströme.

Änderungen in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung führen erwartungsgemäß bei Testpotentialen, die Kaliumauswärtsströme hervorrufen, zu einer Stromzunahme oder Stromabnahme. Leitfähigkeitsänderungen führen ebenfalls zu einer Zu- oder Abnahme der Kaliumauswärtsströme. Änderungen der Aktivierungszeitkonstanten führen zu einer Verlangsamung oder Beschleunigung der Aktivierung von Kaliumauswärtsströmen. Änderungen der Inaktivierungszeitkonstanten sowie des Schaltverhaltens können während eines Testpulses zu einer Zunahme oder Abnahme der Auswärtsströme führen. Das gleiche gilt, wenn die Offenzeiten oder Geschlossenzeiten der zu messenden Kaliumkanäle verändert werden (B. Hille, *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2. Ausgabe (1993), Sinauer Associates inc., Sunderland, Massachusetts, USA).

Besonders bevorzugt exprimieren die verwendeten Wirtszellen die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle auf ihrer Oberfläche. Auf diese Weise können die Substanzen dadurch identifiziert bzw. getestet werden, daß man den Ausstrom von Ionen aus den Zellen durch den erfindungsgemäßen Kaliumkanal mißt. Das Ausströmen von Ionen wird bevorzugt mit der "patch-clamp"-Methode (vgl. z. B. O. P. Hamill et al., *Pflügers Arch.* (1981) 85-100) durch Anlegen depolarisierender Testpotentiale bestimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist ferner eingeschlossen, die erfindungsgemäßen Wirtszellen nach dem Fachmann gut bekannten Methoden mit ^{86}Rb -Ionen zu beladen, die durch Kaliumkanäle so gut wie Kaliumionen permeieren können. Die beladenen Zellen können in Gegenwart von zu testenden Substanzen kultiviert werden. Danach kann der Einfluß der Substanzen auf den ^{86}Rb -Auswärtsstrom der mit ^{86}Rb beladenen Zellen mit dem Fachmann bekannten Me-

thoden gemessen werden (R. S. Rogowski et al., Mol. Pharmacol. 50 (1996) 1167-1177).

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

5

- (a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential mißt,
- (b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- (c) an den Wirtszellen erneut das Membranpotential mißt,

10 wobei der Unterschied zwischen dem Membranpotential vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die einzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des Membranpotentials zu erreichen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist ferner eingeschlossen, die erfindungsgemäßen Wirtszellen (insbesondere
15 solche die Kv4.1, Kv4.2 oder Kv4.3 homomultimere Kaliumkanäle bzw. heteromultimere Kv4.1/Kv4.2, Kv4.1/Kv4.3-, Kv4.2/Kv4.3- oder Kv4.1/Kv4.2/Kv4.3-Kaliumkanäle beliebiger Stöchiometrie nach dem Fachmann gut bekannten Methoden mit fluoreszierenden Membranpotential-sensitiven Farbstoffen, wie z. B. DiBAC (Bis-Barbitursäureoxonol) Farbstoff (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA), zu beladen. Die beladenen Zellen können in Mikrotiterplatten übertragen werden. Mittels eines Bioassayreadergeräts (z. B. der Firma BMG LabTechnologies GmbH, Hanns-Martin-Schleyer-Str. 10, 77656 Offenburg), kann dann der Einfluß der Substanzen auf die Kaliumkanalaktivität fluoreszenzspektroskopisch mit dem Fachmann bekannten Methoden gemessen werden. Das Bioassayreadergerät mißt speziell durch
20 den Unterschied zwischen der Membranpotential-abhängigen Fluoreszenz vor und nach Zugabe der Substanz. Wirkt die Substanz auf die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle, ändert sich das Membranpotential und somit die Membranpotential-abhängige Fluoreszenz. Daraus kann die Aktivität der Substanz auf die erfindungsgemäßen Kaliumkanäle bestimmt werden.

25

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man

30

- a) in den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom mißt,
- b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom erneut mißt,

wobei die Unterschiede zwischen sowohl dem Membranpotential als auch dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern umso höher, je niedriger die einzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des Membranpotentials sowie des Kaliumauswärtsstromes zu erreichen.

35

Überraschenderweise hat sich herausgestellt, daß die Phosphorylierung der erfindungsgemäßen Kv4-Kanäle in Gewebekulturzellen durch Proteinkinasen zu einer drastischen Veränderung der Amplitude der durch Kv4-Kanäle vermittelten transienten Auswärtsströme führt. Insofern betrifft die Erfindung einerseits Wirtszellen, die phosphorylierte Kaliumkanäle enthalten sowie die Messung der Aktivität dieser Testkanäle zur Ermittlung von Substanzen, die Proteinkinasen aktivieren. Gegenstand der Erfindung ist daher auch ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die Proteinkinasen aktivieren, bei dem man

40

- (a) in den erfindungsgemäßen Wirtszellen, die exprimierten Kv4-Kaliumkanäle durch Aktivierung von Proteinkinasen phosphoryliert,
- (b) die Amplitude der durch Kv4-Kanäle vermittelten transienten Auswärtsströme mißt,
- (c) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und (d) die Amplitude der durch Kv4-Kanäle vermittelten transienten Auswärtsströme erneut mißt,

50

wobei die Substanz eine Proteinkinase aktivierende Substanz ist, wenn sich die in (b) und (d) gemessene Amplitude durch Zugabe der Substanz verändert.

Die Phosphorylierung der Kaliumkanäle erfolgt beispielsweise durch Proteinkinase A und C.

55

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden ferner Antikörper zur Verfügung gestellt, die an das isolierte erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder an Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrobiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität binden. Ferner werden Antikörper zur Verfügung gestellt, die an das erfindungsgemäße Kaliumkanalprotein oder an Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität binden, wobei
60 das Kaliumkanalprotein oder die Derivate oder Fragmente desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität Bestandteil eines Kaliumkanals sind und somit eine andere dreidimensionale Struktur aufweisen können als die isolierten erfindungsgemäßen Kaliumkanalproteine. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern sind dem Fachmann allgemein bekannt (E. Harlow und D. Lane, a. a. O.). Die Antikörper sind erhältlich, indem man Tiere mit dem erfindungsgemäßen Kaliumkanalprotein oder Derivaten oder Fragmenten desselben mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder
65 Immunogenität immunisiert. Polyklonale Antikörper werden dann aus dem Serum der Tiere gewonnen, während monoklonale Antikörper aus dem Überstand von Hybridomzellen erhältlich sind. Hybridomzellen sind erhältlich, indem man Antikörper produzierende Zellen mit Tumorzellen fusioniert (E. Harlow and D. Lane, a. a. O.).

Die Erfindung wird im folgenden durch Beispiele, Sequenzprotokolle und Figuren verdeutlicht.

Fig. 1

- A) Nukleotid-Sequenz der humanen Kv4.1 cDNA (SEQ ID NO: 1), aus der der offene Leserahmen abgeleitet wurde. Fettgedruckt ist das erste Startcondon ATG, mit dem der offene Leserahmen startet, und das Stopcodon, mit dem der offene Leserahmen aufhört. 5
- B) Offener Leserahmen der abgeleiteten Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) der humanen Kv4.1 α -Untereinheit. Die sechs hydrophoben, möglicherweise membranspannenden Segmente sind mit S1 bis S6 markiert. Die Porenbildende Domäne ist mit P markiert. Die Zahlen an der rechten Seite beziehen sich auf die jeweils letzte Aminosäure in der betreffenden Zeile. Die Markierungen O, I, □, und Δ zeigen mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C, Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase II beziehungsweise Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase). 10

Fig. 2

- A) Nucleotid-Sequenz der humanen Kv4.2 cDNA (SEQ ID NO: 3), aus der der offene Leserahmen abgeleitet wurde wie im Fig. 1. Fettgedruckt ist das erste Startcondon ATG, mit dem der offene Leserahmen startet, und das Stopcodon, mit dem der offene Leserahmen aufhört. 15
- B) Offener Leserahmen der abgeleiteten Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 4) der humanen Kv4.2 α -Untereinheit. Die sechs hydrophoben, möglicherweise membranspannenden Segmente sind mit S1 bis S6 markiert. Die Porenbildende Domäne ist mit P markiert. Die Zahlen an der rechten Seite beziehen sich auf die jeweils letzte Aminosäure in der betreffenden Zeile. Die Markierungen O, I, □, und Δ zeigen mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C, Ca²⁺-Calmodulin abhängige Proteinkinase II beziehungsweise Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase). 20
- C) Ähnlichkeit der humanen (h)Kv4.2 Proteinsequenz (SEQ ID NO: 4) zu Proteinsequenzen anderer Mitglieder der humanen Kv4-Kaliumkanalfamilie (Kv4.1 (SEQ ID NO: 2) und Kv4.3. Es von Kv4.3 gibt es zwei Versionen. Gezeigt ist die lange Version (hKv4.32), die im Vergleich zur kürzeren Version ein zusätzliches Exon enthält, das unterstrichen ist. 25

Fig. 3

- A) Northern-Analyse der Expression humaner Kv4.1 mRNA in verschiedenen Geweben. Die aufgetragene mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Die humane Kv4.1 cDNA (SEQ ID NO: 1) wurde als Hybridisierungssonde verwendet. Eine ca. 5 kb große Kv4.1 mRNA wurde mehr oder weniger in allen Geweben detektiert. Die RNA-Menge in den einzelnen Bahnen wurde durch eine Hybridisierung mit einer markierten β -Aktin cDNA Probe kontrolliert. 30
- B) Northern-Analyse der Expression humaner Kv4.2 mRNA in verschiedenen Geweben. Die aufgetragene mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Die humane Kv4.2 cDNA (SEQ ID NO: 3) wurde als Hybridisierungssonde verwendet. Nur in mRNA aus Gehirn bzw. Gehirnregionen wurde eine 6.5 kb große Kv4.2 mRNA detektiert. Die RNA-Menge in den einzelnen Bahnen wurde durch eine Hybridisierung mit einer markierten β -Aktin cDNA Probe kontrolliert. 35
- C) Northern Analyse der Expression der Kv4.3 mRNA in verschiedenen Geweben. Die aufgetragene mRNA ist über der jeweiligen Spur vermerkt. Die humanen Kv4.3 cDNA (Nukleotide 1420-2644, Acc. AF120491) wurde als Hybridisierungssonde verwendet. In Gehirn, Herz, Placenta, Lunge, Leber und Skelettmuskel wurde eine 8.5 kb große Kv4.3 mRNA detektiert. Die RNA-Menge in den einzelnen Bahnen wurde durch Hybridisierung mit einer markierten β -Aktin cDNA Probe überprüft. 40

Fig. 4

Lokalisation des hKv4.1 Kaliumkanal-Gens, KCND1, in der Region des humanen Chromosoms Xp11.23. Links ist eine schematische Karte der Xp11.1. bis Xp21-Region; rechts ist die Lage bekannter polymorpher Marker im Vergleich zu KCND1 angegeben. 45

Fig. 5

Lokalisation des hKv4.2-Kaliumkanal-Gens, KCND2, in der Region des humanen Chromosoms 7q31-32. 50

- A) Nachweis von KCND2 DNA in einem DNA-Panel aus Nager/Mensch-IIybridzelllinien. Die DNA Proben des Panels wurden einer Polymerasekettenreaktion unterzogen unter Verwendung KCND2-DNA spezifischer sense- und antisense Primer (SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9). Die amplifizierten DNA-Produkte wurden in einem 1.5% Agarose-Gel separiert und mittels Ethidium-bromid-Färbung sichtbar gemacht. Die Nummern oberhalb der Gelbahnen beziehen sich auf die verschiedenen eingesetzten Hybridzelllinien. Auf der linken Seite sind Größemarkierungen in kb DNA angegeben; auf der rechten Seite zeigt der Pfeil das erwartete KCND2-Produkt von 3 bp an. 55
- B) Humaner Chromosomenbesatz der in A getesteten Nager/Mensch-Hybridzelllinien. Die Spalten beziehen sich auf die DNA, die in der jeweils darüber liegenden Gelbahn getestet wurde. Die Chromosomen sind mit X angegeben; inkomplette Chromosomen mit einem +Zeichen. Die beiden Sternchen zeigen an, in welchen Bahnen ein amplifiziertes KCND2-Produkt gefunden wurde. Daraus geht hervor, daß das KCND2-Gen auf Chromosome 7 lokalisiert ist. 60

siert ist.

C) Chromosomale Lokalisierung bei 7q31-32 mit einer FISH-Analyse von Metaphase-Chromosomen. Verwendet wurde eine biotinylierte KCND2-Sonde.

5

Fig. 6

Genomische Struktur der Gene KCND1, KCND2, KCND3. Die schwarzen Kästchen entsprechen Exonen der offenen Leserahmen. Exone 1 enthalten auch 5'-nichttranslatierte Sequenzen, schematisch als weiße Kästchen dargestellt; dgl. enthalten Exone 6 jeweils 3'-nichttranslatierte Sequenzen. Graue Balken entsprechen Intronsequenzen.

10

Fig. 7

Nukleotid-Sequenzen des humanen KCND1-Gens. Kodierende Bereiche sind durch Großbuchstaben, nichtkodierende Bereiche (d. h. Introne bzw. 5' und 3' nichttranslatierte Regionen) sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

15

A) Nukleotid-Sequenz des Exons 1 des humanen KCND1-Gens (SEQ ID NO: 5). Das Startkodon ist durch Fettdruck hervorgehoben.

20

B) Nukleotid-Sequenz der Exone 2-5 sowie der angrenzenden Introne des humanen KCND1-Gens (SEQ ID NO: 6).

C) Nukleotid-Sequenz der Exone 6 des humanen KCND1-Gens (SEQ ID NO: 7). Das Stopkodon ist durch Fettdruck hervorgehoben.

25

Fig. 8

Funktionelle Eigenschaften von hKv4.1 Kanälen, die durch transiente Expression von hKv4.1 α -Untereinheiten in HEK293-Zellen gebildet wurden. Auswärtsströme gemessen mit der "patch-clamp"-Methode an mit hKv4.1-cDNA (SF-Q ID NO: 1) transient transfizierten HEK 293 Zellen. Das Haltepotential war bei -100 mV, das Testpotential bei +40 mV. Die mittlere Stromdichte betrug 60 ± 20 pA/pF.

30

An der beispielhaft gezeigten Stromkurve der hKv4.1 vermittelten Auswärtsströme wurde bezüglich der Inaktivierung Zeitkonstanten τ angepaßt nach dem Fachmann gut bekannten Verfahren. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierung bei +40 mV ließ sich durch zwei Zeitkonstanten ($\tau_{h,1}$ bzw. $\tau_{h,2}$) gut beschreiben ($\tau_{h,1} = 31.9 \pm 3.5$; $\tau_{h,2} = 354 \pm 36$). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von in vierzehn Experimenten durchgeführten Messungen. Das Amplitudenverhältnis von $\tau_{h,1}$ und $\tau_{h,2}$ zueinander ist 3 : 1 (76% zu 24%).

35

Fig. 9

Funktionelle Eigenschaften von hKv4.2-Kanälen, die durch transiente Expression von hKv4.2 α -Untereinheiten in HEK 293-Zellen gebildet wurden.

40

A) Auswärtsströme gemessen mit der "patch-clamp"-Methode an hKv4.2-cDNA (SEQ ID NO: 3) transient transfizierten HEK 293 Zellen.

45

B) Auftragung normalisierter Leitfähigkeiten (G/G_{\max} , Ordinate) für human Kv4.2-Ströme gegen das im Test vorhandene Membranpotential (Abzisse). Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm Standardfehler von in sechs Experimenten durchgeführten Messungen dar. Die durchgezogene Linie stellt die Ausgleichskurve gemäß der Boltzmann-Gleichung mit $V_{0.5} = -3.2 \pm 1.5$ mV dar.

50

C) Auftragung der Aktivierungszeitkonstanten τ_m in ms für humane Kv4.2-Ströme gemessen in Abhängigkeit vom im Test vorhandenen Membranpotential in mV. Die Messungen wurden wie in A durchgeführt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm Standardfehler von in sechs Experimenten durchgeführten Messungen dar.

55

D) Auftragung der Inaktivierungszeitkonstanten $\tau_{h,1}$ und $\tau_{h,2}$ in ms für humane Kv4.2-Ströme gemessen in Abhängigkeit vom im Test vorhandenen Membranpotential in mV. Den wie in A gemessenen Stromverläufe wurden zwei Inaktivierungszeitkonstanten angepaßt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm Standardfehler von in sechs Experimenten durchgeführten Messungen dar.

60

E) Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung der humanen Kv4.2-Ströme vom Vorpulspotential. Datenpunkte entsprechen den gemessenen Stromamplituden bei +60 mV nach einem 500 ms langen Vorpuls bei dem angegebenen Vorpulspotential. Dieses wurde in 5 mV Schritten zwischen -90 und -15 mV variiert. Den Datenpunkten wurde eine Boltzmann-Gleichung angepaßt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert \pm Standardfehler von in sechs Experimenten durchgeführten Messungen dar. Die gemessenen Peak-Amplituden (I) wurden normalisiert, bezogen auf die bei +60 mV gemessenen maximale Peak-Amplitude (I_{\max}), die mit einem Vorpuls von -90 mV erhalten wurde.

65

F) Erholung der inaktivierten humanen Kv4.2 Ströme. Die Erholungsphase wurde mit gepaarten 500 ms langen Testpulsen bei +60 mV gemessen, die unterbrochen wurden durch einen Zwischenpuls unterschiedlicher Dauer bei 100 mV. Die Dauer des Zwischenpulses variierte zwischen 10 ms und 600 ms. I_0 entspricht der Peak-Amplitude, die gemessen wurde mit einem +60 mV Testpuls nach einer Erholungsphase von 15 s bei -100 mV. Die anderen gemessenen Peakamplituden, die mit kürzeren Zwischen Pulsen erhalten wurden, wurden darauf normalisiert (I/I_0). Die an die Datenpunkte angepaßte Linie entspricht einer mono-exponentiellen Funktion mit einer Zeitkonstante τ_{rec} von 118.3 ± 5.3 ms und wurde von in sechs Experimenten durchgeführten Messungen erhalten.

70

Fig. 10

Inhibierung von humanen Kv4.2-Strömen nach Applikation von Wirkstoffen.

Die transienten Auswärtsströme wurden mit der "patch-clamp"-Methode wie in Fig. 4 an hKv4.2-cDNA (SEQ ID NO: 3) transient transfizierten IIEK 293 Zellen gemessen mit einem Haltepotential von -100 mV und 500 ms langen Testpotentialen bei +40 mV. Nach der Registrierung eines transienten Auswärtsstroms (Kontrolle) wurde die in der Meßkammer befindliche Badlösung mit dem angegebenen Kaliumkanalblocker bzw. Wirkstoff in der angegebenen Konzentration für 15 min. perfundiert. Danach wurde eine zweite Stromregistrierung durchgeführt. 4-AP = 4-Aminopyridin; TEA = Tetraethylammonium.

Beispiele

Beispiel 1

Isolierung von Klonen aus humanen cDNA-Bibliotheken und Polymerasekettenreaktion

1 · 10⁶ Plaques einer humanen cortex λgt 10 cDNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) wurden in 20 NZ Platten (NZ: 16 g/l NZ-Pulver, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Bacto-Agar; Chemikalien von Gibco BRL, Eggenstein, DE) mit einem Durchmesser von 150 mm ausplattiert. Die genomische Phagen-DNA wurde dann auf 20 Membranfilter (Duralon-UV Membran, Stratagene) transferiert. Es folgte eine Hybridisierung der Filter in 50% Formamid, 0.8 M NaCl, 20 mM Pipes (Piperazin-N,N-bis [2-ethansulfonsäure], Sigma), 1% SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperm-DNA, in H₂O und mit ³²P-markierter Maus Kv4.1 (M. D. Pak et al., Proc Natl Acad Sci USA 88 (1991) 4386-4390) als Probe. Diese Hybridisierung wurde bei 60°C für 18 Stunden durchgeführt. Die Filter wurden anschließend mit 0.1×SET/0.1% SDS in H₂O (20×SET: 3 M NaCl, 400 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM EDTA; Chemikalien von Sigma, für 0.1×SET wird 20×SET 1 : 200 verdünnt) gewaschen. Nach erfolgter Autoradiographie bei -70°C wurden die auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N. Y.) sichtbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet.

Es wurde ein positiver Phagenklon erhalten, der eine 2800 bp lange hKv4.1 cDNA enthält. Das Insert des Phagen wurde mittels der Phagen-spezifischen Primer 5'-GACTCCTGGAGCCCG-3' (5'Insert screening amplimer, (Clontech, Palo Alto, CA), SEQ ID NO: 10) und 5'-GGTAGCGACCGGCGC-3' (3' Insert screening amplimer, (Clontech, Palo Alto, CA), SEQ ID NO: 11) ansequenziert und anschließend mittels PCR unter der Verwendung Insert (hKv4.1)-spezifischer Primer amplifiziert. Die Bedingungen der PCR-Reaktion waren wie folgt: 30 Reaktionszyklen mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) bestehend aus 95°C-30sec, 55°C-30sec, und 72°C-2 min. Als "Sense-Primer" wurde eingesetzt 5'-AGCCCCCACCATCCTGGAGA-3' (h41-1; SEQ ID NO: 12) und als "Antisense-Primer" 5'-CTGGGGGCCCCAGCAGAGGAC-3' (h41-2; SEQ ID NO: 13). Das resultierende hKv4.1 PCR cDNA-Fragment war 2711 bp lang und enthielt den kompletten offenen Leserahmen der hKv4.1 cDNA sowie 80 bp 5' UTR und 687 bp 3' UTR. Dieses Fragment wurde in einem Agarose-Gel elektrophoretisch isoliert.

Beispiel 2

Isolierung von Klonen aus humanen genomischen DNA-Bibliotheken

1 · 10⁶ Plaques einer humanen genomischen λEMBL3 SP6/T7 Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) mit ³²P-markierter humaner Kv4.1 cDNA als Probe. Diese Hybridisierung wurde bei 60°C für 18 Stunden durchgeführt. Die Filter wurden anschließend mit 0.1×SET/0.1% SDS in H₂O (20×SET: 3 M NaCl, 400 mM Tris/HCL, pH 7.4, 200 mM EDTA; Chemikalien von Sigma, für 0.1×SET wird 20×SET 1 : 200 verdünnt) gewaschen. Nach erfolgter Autoradiographie bei -70°C wurden die auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N. Y.) sichtbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet. Ein Phagenklon wurde durch eine Hybridisierung, durchgeführt wie oben, identifiziert. Durch direkte Sequenzierung der Phagen-DNA zeigte sich, daß dieser Phage die komplette kodierende Sequenz des KCND1-Gens enthielt. (SEQ ID NO: 5, 6, 7).

Beispiel 3

DNA-Sequenzierung

Das hKv4.1 PCR cDNA Fragment wurde mit Bsp120I (MBI fermentas) geschnitten und in die in die EcoRV/Bsp120I-Schnittstellen des pcDNA3 Vektors (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert. Die hKv4.1 cDNA wurde dann unter Verwendung des BigDye terminator cycle sequencing kits (Perkin Elmer, XY) sequenziert. Die Sequenzreaktionen wurden anschließend auf automatischen Sequenzierern (ABI 377 or Prism 310 automated sequencer (Perkin Elmer, XY)) analysiert. Das Plasmid-spezifische Oligonukleotid T7 (Stratagene, La Jolla, CA, SEQ ID NO: 14) sowie hKv4.1-spezifische Oligonukleotide (h41-1-h41-7 (SEQ IDs NO: 12, 13, 15-19) wurden für die Sequenzierungen als Primer verwendet. Der Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) enthält jeweils 2 mg poly-A⁺ mRNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Die hKv4.1 cDNA wurde ³²P-markiert (T. Maniatis et al., a. a. O.) und dann als Hybridisierungssonde verwendet. Die Sonde wurde in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5×SET, 10×Denhardt's (100×Denhardt's: 20 g/l Ficoll 400 (Sigma), 20 g/l BSA (Sigma), 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (Merck), 1 : 10 verdünnt), 1% SDS (Biorad), 100 mB/ml Heringssperm DNA (Sigma) in H₂O) bei 42°C 24 Stunden an die mRNA hybridisiert. Der Blot wurde anschließend nacheinander in Waschlösung 1 (2×SSC (20×SSC: 173 g/l NaCl, 88.2 g/l NaCitrat, pH 7.0, alle Chemikalien von Sigma, für 2×SSC 1 : 10 verdünnt)); 0.1% SDS; in H₂O) bei RT und in Waschlösung 2 (0.1×SSC (20×SSC 1 : 200 verdünnt); 0.1% SDS; in H₂O) bei 50°C gewaschen. Nach dem Waschen er-

folgte eine Autoradiographie auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N. Y.) bei -70°C . Der gleiche Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) wurde mit einer ^{32}P -markierten hKv4.3 cDNA (Nukleotide 1430–2644; GenBank Access NO. AF120491) als Probe unter den oben ausgeführten Bedingungen hybridisiert, nach der Hybridisierung gewaschen und autoradiographiert.

5

Beispiel 4

Humane chromosomale Lokalisation des KCND1 Gens

- Das Genebridge 4 Hybridzellpanel (bezogen durch Research Genetics, Huntsville, AL) wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion unter der Verwendung KCND1-spezifischer Oligonukleotide untersucht. Die PCR Reaktionen wurden mit 25 ng DNA von jedem der 93 Hybridklone und mit humaner sowie genomischer DNA vom Hamster als Kontrollen durchgeführt. Als "Sense-Primer" wurde eingesetzt 5'-GACTTGGAAGAATACGCTGGAC-3' (h41-3; SEQ ID NO: 15) und als "Antisense-Primer" 5'-TCATGACAC'TCCG'AGGAAGC-3' (h41-8; SEQ ID NO: 20). Die PCR-Bedingungen waren 5 min 95°C 1 Zyklus; 45 sec 95°C , 1 min 59°C , 1 min 72°C für 30 Zyklen; 10 min 72°C 1 Zyklus; Taq Polymerase (GibcoBRL,). Die Ergebnisse der PCR wurden durch den "Radiation Hybrid Mapping Server" am Whitehead Institute (<http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) analysiert. Für die Analyse wurde ein LOD-score von 15 gewählt.

20

Beispiel 5

Funktionelle Expression und elektrophysiologische Technik

- Das hKv4.1 PCR-Fragment (SEQ ID NO: 1) wurde in den dem Fachmann gut bekannten Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) wie oben ausgeführt einkloniert. Insgesamt 2 μg Plasmid-DNA (pcDNA3-hKv4.1) wurde zur Transfektion von HEK293-Zellen mit DMRIE-C-Reagens (eine 1 : 1 Mischung aus Kation-Lipid DMRIE und Cholesterol, Gibco-BRL, Life Technologies) eingesetzt. 500 ml Opti-MEM 1-Medium (Gibco-BRL, Life Technologie) mit 2 μg Plasmid-DNA und 500 ml Opti-MEM 1-Medium mit 6.4 μl DMRIE-C-Reagens wurden zusammengemischt, und anschließend bei RT für 45 Minuten inkubiert, wobei ein Liposom-DNA-Komplex gebildet wurde. $2 \cdot 10^5$ HEK293 Zellen in einer 35-mm Schale wurden zuerst mit Opti-MEM 1-Medium gewaschen, danach wurde die Lösung mit diesem Lipid-DNA-Komplex auf die Zellschicht ausplattiert. Nach einer Inkubation für 5–6 Stunden bei 37°C in einem Inkubator unter 5% CO_2 wurde die Lösung durch normales Medium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 12–24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen in eine neue Schale (35 mm) für die elektrophysiologischen Messungen umgesetzt.

- Auswärtsströme wurden 24–48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik (O. P. Hamill et al., Pflügers Arch. (1981) 85–100) gemessen. Die Mikropipetten wurden mit einem DMZ-Universal Puller (Zeitz Instruments, Augsburg, Germany) gezogen und hatten einen Widerstand zwischen 2–3 M Ω nach der Füllung mit der intrazellulären Lösung (95 mM K-Glukonat, 20 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Glutathion, 2 mM Na_2ATP , pH 7.2). Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die HEK 293 Zellen in einer extrazellulären Lösung (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 10 mM Glucose, 20 mM Sucrose, pH 7.4, alle Chemikalien von Sigma) bei Raumtemperatur auf einem Haltepotential von -100 mV gehalten. Die bei positiveren Potentialen hervorgerufenen Auswärtsströme wurden mit einem EPC9 Patch-clamp Verstärker (HEKA Elektronik, Darmstadt, DE) gemessen. Das dem Fachmann gut bekannte Softwareprogramm PULSE + PULSEFIT (HEKA Elektronik, Darmstadt, DE) wurde für die Datenaufnahme und Datenanalyse verwendet.

45

Beispiel 6

Isolierung von Klonen aus humanen cDNA-Bibliotheken

- $1 \cdot 10^6$ Plaques einer humanen cortex $\lambda\text{gt}10$ cDNA-Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) wurden in 20 NZ Platten (NZ: 16 g/l NZ-Pulver, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Bacto-Agar; Chemikalien von Gibco BRL, Eggenstein, DE) mit einem Durchmesser von 150 mm ausplattiert. Die genomische Phagen-DNA wurde dann auf 20 Membranfilter (Duralon-UV Membran, Stratagene) transferiert. Es folgte eine Hybridisierung der Filter in 50% Formamid, 0.8 M NaCl, 20 mM Pipes (Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure], Sigma), 1% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte Heringssperm-DNA, in H_2O und mit ^{32}P -markierter Ratte Kv4.2 cDNA (T. J. Baldwin et al, Neuron 7 (1991) 471–483) als Probe. Diese Hybridisierung wurde bei 60°C für 18 Stunden durchgeführt. Die Filter wurden anschließend mit $0.1 \times \text{SET}$ 0.1% SDS in 11,0 ($20 \times \text{SET}$: 3 M NaCl, 400 mM Tris/HCl, pH 7.4, 200 mM EDTA; Chemikalien von Sigma, für $0.1 \times \text{SET}$ wird $20 \times \text{SET}$ 1 : 200 verdünnt) gewaschen. Nach erfolgter Autoradiographie bei -70°C wurden die auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N. Y.) sichtbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet.

60

Es wurde ein positiver Phagenklon erhalten, der eine 2500 bp lange hKv4.2 cDNA enthält. DNA des Phagen wurde mit EcoRI verdaut. Das hKv4.2 EcoRI cDNA-Fragment wurde in einem Agarose-Gel elektrophoretisch isoliert.

Beispiel 7

65

Isolierung von Klonen aus humanen genomischen DNA-Bibliotheken

$1 \cdot 10^6$ Plaques einer humanen genomischen $\lambda\text{EMBL3 SP6/17}$ Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA) mit ^{32}p -markier-

ter Ratte Kv4.2 cDNA (T. J. Baldwin et al, Neuron 7 (1991) 471-483) als Probe. Diese Hybridisierung wurde bei 60°C für 18 Stunden durchgeführt. Die Filter wurden anschließend mit 0.1xSET/0.1% SDS in H₂O (20xSET: 3 M NaCl, 400 mM Tris/HCL, pH 7.4, 200 mM EDTA; Chemikalien von Sigma, für 0.1xSET wird 20xSET 1 : 200 verdünnt) gewaschen. Nach erfolgter Autoradiographie bei -70°C wurden die auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N. Y.) sichtbaren Signale den entsprechenden Plaques auf den Platten zugeordnet). Ein DNA-Fragment wurde durch eine Hybridisierung, durchgeführt wie oben, identifiziert. Dies war ein 1.0 kb BamHI/XbaI Fragment. Die Sequenzierung des Fragments zeigte, daß es nur einen Teil der kodierenden Region enthielt, der den Aminosäuren 1 bis 218 des abgeleiteten offenen hKv4.2 Leserahmens entspricht (SEQ ID NO: 21).

Beispiel 8

DNA-Sequenzierung

Das EcoRI-hKv4.2 cDNA Fragment wurde in die EcoRI-Schnittstellen des Bluescript Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) kloniert. Die hKv4.2 cDNA wurde dann nach der Methode von Sanger et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467) mit T7-DNA Polymerase (Sequenase, US Biochemicals, Cleveland, Ohio) sequenziert. Plasmid-spezifische Oligonukleotide M13, Reverse, T3 und T7 (Stratagene, La Jolla, CA, SEQ ID NO: 14, 22-24) wurden für die Sequenzierungen als Primer verwendet. Der Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) enthielt jeweils 2 mg poly-A⁺ mRNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas. Die hKv4.2 cDNA wurde ³²Pmarkiert (T. Maniatis et al., a. a. O.) und dann als Hybridisierungs-sonde verwendet. Die Sonde wurde in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5xSET, 10xDenhardt's (100xDenhardt's: 20 g/l Ficoll 400 (Sigma), 20 g/l BSA (Sigma), 20 g/l Polyvinylpyrrolidon (Merck), 1 : 10 verdünnt), 1% SDS (Biorad), 100 mb/ml Heringsspermin DNA (Sigma) in H₂O) bei 42°C 24 Stunden an die mRNA hybridisiert. Der Blot wurde anschließend nacheinander in Waschlösung 1 (2xSSC (20xSSC: 173 g/l NaCl, 88,2 g/l NaCitrat, pH 7,0, alle Chemikalien von Sigma, für 2xSSC 1 : 10 verdünnt); 0.1% SDS; in H₂O) bei RT und in Waschlösung 2 (0.1xSSC (20xSSC 1 : 200 verdünnt; 0.1% SDS; in H₂O) bei 50°C gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte eine Autoradiographie auf den Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, N. Y.) bei -70°C. Der gleiche Multiple Tissue Northern (MTN) blot (Clontech, Palo Alto, CA) wurde mit einer ³²P-markierten hKv4.3 cDNA (Nuklotid 1430-2644; EMBL Access NO. AF120491) als Probe unter den oben ausgeführten Bedingungen hybridisiert, nach der Hybridisierung gewaschen und autoradiographiert.

Beispiel 9: Polymerasekettenreaktion

Der hKv4.2 cDNA-Phagenklon wurde mit EcoRI verdaut. Das EcoRI-Fragment wurde in die Polylinker-Region des EcoRI-linearisierten Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogene, Carlsbad, CA) einkloniert, um pcDNA3-hKv4.2 zu erhalten. Dieser wurde in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) als Matrize verwendet, um eine Kozak-Sequenz (5'-CCACC-3', SEQ ID NO: 25) vor das Startcodon des hKv4.2 offenen Leserahmens einzubauen und gleichzeitig den nicht-kodierenden 5'-Bereich der hKv4.2 cDNA zu verkürzen. Die Bedingungen der PCR-Reaktion waren wie folgt: 20 Reaktionszyklen mit Klen Taq Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) bestehend aus 94°C-1 min, 50°C-30sec. und 72°C-30sec. Als "Sense-Primer" wurde eingesetzt 5'-ATTAAGCTTCCACCATTGGCGGCGGGGGTGGCAGCG-3 (h42koz; SEQ ID NO: 26) und als "Antisense-Primer" 5'-ACATAGTAGAACACCAGGGCC-3 (h423; SEQ ID NO: 28). Der h42koz-Primer enthielt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Hind III vor der Kozak-Konsensussequenz (SEQ ID NO: 25). Das PCR Reaktionsprodukt war 673 bp lang und entsprach der hKv4.2 cDNA Sequenz von Nukleotid 340 bis 399 (SEQ ID NO: 3) und 14 zusätzliche Basenpaare, die dem eingesetzten Primer h42koz entsprachen. Das PCR-Produkt wurde mit HINDIII und BstXI geschnitten. Letzteres Restriktionsenzym erkennt eine Schnittstelle in der hKv4.2 cDNA Sequenz bei Nukleotiden 971-980 (SEQ ID NO: 3). Parallel wurde pcDNA3-hKv4.2 mit HindIII und BstXI verdaut, wodurch die ersten 980 Basenpaare der einklonierten hKv4.2 cDNA eliminiert wurden. Mit der verdauten pcDNA3-hKv4.2 wurde das HINDIII/BstXI PCR Fragment mit Hilfe von T4-DNA Ligase (MBI Fermentas, Buffalo, NY) ligiert und der Klon pcDNA3-hKv4.2koz wurde erhalten. Die hKv4.2koz Sequenz (SEQ ID NO: 26) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Beispiel 10

Humane chromosomale Lokalisation

Primer hg427 (SEQ ID NO: 8) und hg428 (SEQ ID NO: 9) wurden in PCRs eingesetzt zur Amplifizierung der genomischen KCND2-DNA. Als Matrize wurde ein DNA Panel aus Nager/Mensch-Hybridzelllinien verwendet (Firma) und Klen Taq Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA). Die Reaktionsbedingungen waren 35 Zyklen mit 92°C-2 min., 50°C-30 sec., 72°C-20 sec. Ein 12 kb langer humaner genomischer XDNA-Klon, der den kodierenden Bereich für Aminosäuren 1-211 der hKv4.2 α -Untereinheit enthielt, wurde mit Biotin-16-dUTP (Boehringer, Mannheim) markiert und dann für eine FISH-Analyse als Sonde verwendet. Die FISH-Analyse erfolgte nach der von P. Lichter et al., PNAS USA 85 (1988) 9664-9668 und C. Fonatsch et al., Int. J. Cancer 26 (1980) 749-754 beschriebenen Methode. Die Signale wurden mit Fluoreszenz-Isothiozyanat gekoppeltem Avidin-DCSF (Vector Laboratories) detektiert und die Lokalisierung der Signale in Metaphase-Chromosomen wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (C. Zeiss, LSM 410, Germany) durchgeführt.

Funktionelle Expression und elektrophysiologische Technik

5 Das DNA-Fragment (SEQ ID NO: 3) wurde in den dem Fachmann gut bekannten Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) wie oben ausgeführt einkloniert. Insgesamt 2 µg Plasmid-DNA (pcDNA3-hKv4.2ko) wurde zur Transfektion von HEK293-Zellen mit DMRIE-C-Reagens (eine 1 : 1 Mischung aus Kation-Lipid DMRIE und Cholesterol, Gibco-BRL, Life Technologies) eingesetzt. 500 ml Opti-MEM 1-Medium (Gibco-BRL, Life Technologic) mit 2 µg Plasmid-DNA und 500 ml Opti-MEM 1-Medium mit 6,4 µl DMRIE-C-Reagens wurden zusammengemischt, und anschließend bei RT für 45 Minuten inkubiert, wobei ein Liposom-DNA-Komplex gebildet wurde. 2 · 10⁵ HEK293 Zellen in einer 35-mm Schale wurden zuerst mit Opti-MEM 1-Medium gewaschen, danach wurde die Lösung mit diesem Lipid-DNA-Komplex auf die Zellschicht ausplattiert. Nach einer Inkubation für 5–6 Stunden bei 37°C in einem Inkubator unter 5% CO₂ wurde die Lösung durch normales Medium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 12–24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 · 10⁴ Zellen in eine neue Schale (35 mm) für die elektrophysiologischen Messungen umgesetzt.

15 Auswärtsströme wurden 24–48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe der whole-cell Konfiguration der patch-clamp Technik (O. P. Hamill et al., Pflügers Arch. (1981) 85–100) gemessen. Die Mikropipetten wurden mit einem DMZ-Universal Puller (Zeitz Instruments, Augsburg, Germany) gezogen und hatten einen Widerstand zwischen 2–3 MΩ nach der Füllung mit der intrazellulären Lösung (95 mM K-Glukonat, 20 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM, MgCl₂, 11 mM EGTA, 10 mM HEPES, 2 mM Glutathion, 2 mM Na₂ ATP, pH 7.2). Für die elektrophysiologischen Messungen wurden die HEK 293 Zellen in einer extrazellulären Lösung (135 mM NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 HEPES, 10 Glucose, 20 Sucrose, pH 7.4, alle Chemikalien von Sigma) bei Raumtemperatur auf einem Haltepotential von –100 mV gehalten. Die bei positiveren Potentialen hervorgerufenen Auswärtsströme wurden mit einem EPC9 Patch-clamp Verstärker (HEKA Elektronik, Darmstadt, DE) gemessen. Das dem Fachmann gut bekannte Softwareprogramm PULSE + PULSEFIT (HEKA Elektronik, Darmstadt, DE) wurde für die Datenaufnahme und Datenanalyse verwendet.

DE 199 63 612 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungsgesellschaft Genion m.b.H.

<120> Neue spannungsabhängige Kaliumkanäle aus der
Kv4-Familie sowie deren Verwendung zur Entwicklung von
Therapeutika

<130> p049902

<140>

<141>

<160> 29

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2711

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (84)..(2021)

<223> Offener Leserahmen fuer hKv4.1 alpha-Untereinheit

<400> 1

agccccacc atcctggaga tagccacatt ctctctaaacg ccaccctcac taagtctccc 60

tgggcttgagg gagtggcacg atg gcg gca ggc ctg gcc acg tgg ctg cct ttt 113
Ala Ala Gly Leu Ala Thr Trp Leu Pro Phe
1 5 10

gct cgg gca gca gca gtg ggc tgg ctg ccc ctg gcc cag caa ccc ctg 161
Ala Arg Ala Ala Val Gly Trp Leu Pro Leu Ala Gln Gln Pro Leu
15 20 25

ccc ccg gca ccg ggg gtg aag gca tct cga gga gat gag gtt ctg gtg 209
Pro Pro Ala Pro Gly Val Lys Ala Ser Arg Gly Asp Glu Val Leu Val
30 35 40

gtg aac gtg agc gga cgg cgc ttt gag act tgg aag aat acg ctg gac 257
Val Asn Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu Thr Trp Lys Asn Thr Leu Asp
45 50 55

cgc tac cca gac acc ttg ctg ggc agc tcg gag aag gaa ttc ttc tac 305
Arg Tyr Pro Asp Thr Leu Leu Gly Ser Ser Glu Lys Glu Phe Phe Tyr
60 65 70

gat gct gac tca ggc gag tac ttc ttc gat cgc gac cct gac atg ttc 353
Asp Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Asp Met Phe
75 80 85 90

cgc cat gtg ctg aac ttc tac cga acg ggg cgg ctg cat tgc cca cgg 401
Arg His Val Leu Asn Phe Tyr Arg Thr Gly Arg Leu His Cys Pro Arg
95 100 105

cag gag tgc atc cag gcc ttc gac gaa gag ctg gct ttc tac ggc ctg 449
Gln Glu Cys Ile Gln Ala Phe Asp Glu Glu Leu Ala Phe Tyr Gly Leu
110 115 120

DE 199 63 612 A 1

	gtt	ccc	gag	cta	gtc	ggg	gac	tgc	tgc	ctt	gaa	gag	tat	cgg	gac	cga	497
	Val	Pro	Glu	Leu	Val	Gly	Asp	Cys	Cys	Leu	Glu	Glu	Tyr	Arg	Asp	Arg	
			125					130					135				
5	aag	aag	gag	aat	gcc	gag	cgc	ctg	gca	gag	gat	gag	gag	gca	gag	cag	545
	Lys	Lys	Glu	Asn	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala	Glu	Asp	Glu	Glu	Ala	Glu	Gln	
		140					145					150					
10	gcc	ggg	gac	ggc	cca	gcc	ctg	cca	gca	ggc	agc	tcc	ctg	cgg	cag	cgg	593
	Ala	Gly	Asp	Gly	Pro	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Arg	
	155					160					165					170	
15	ctc	tgg	cgg	gcc	ttc	gag	aat	cca	cac	acg	agc	acc	gca	gcc	ctc	gtt	641
	Leu	Trp	Arg	Ala	Phe	Glu	Asn	Pro	His	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	
					175					180					185		
20	ttc	tac	tat	gtg	acc	ggc	ttc	ttc	atc	gcc	gtg	tgc	gtc	atc	gcc	aat	689
	Phe	Tyr	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe	Phe	Ile	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	
				190					195					200			
25	gtg	gtg	gag	acc	atc	cca	tgc	cgc	ggc	tct	gca	cgc	agg	tcc	tca	agg	737
	Val	Val	Glu	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	
			205					210					215				
30	gag	cag	ccc	tgt	ggc	gaa	cgc	ttc	cca	cag	gcc	ttt	ttc	tgc	atg	gac	785
	Glu	Gln	Pro	Cys	Gly	Glu	Arg	Phe	Pro	Gln	Ala	Phe	Phe	Cys	Met	Asp	
		220					225					230					
35	aca	gcc	tgt	gta	ctc	ata	ttc	aca	ggg	gaa	tac	ctc	ctg	cgg	ctg	ttt	833
	Thr	Ala	Cys	Val	Leu	Ile	Phe	Thr	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Leu	Phe	
	235				240				245							250	
40	gcc	gcc	ccc	agc	cgt	tgc	cgc	ttc	ctg	cgg	agt	gtc	atg	agc	ctc	atc	881
	Ala	Ala	Pro	Ser	Arg	Cys	Arg	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Met	Ser	Leu	Ile	
				255					260						265		
45	gac	gtg	gtg	gcc	atc	ctg	ccc	tac	tac	att	ggg	ctt	ttg	gtg	ccc	aag	929
	Asp	Val	Val	Ala	Ile	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Val	Pro	Lys	
				270				275						280			
50	aac	gac	gat	gtc	tct	ggc	gcc	ttt	gtc	acc	ctg	cgt	gtg	ttc	cgg	gtg	977
	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly	Ala	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Val	Phe	Arg	Val	
			285				290						295				
55	ttt	cgc	atc	ttc	aag	ttc	tcc	agg	cac	tca	cag	ggc	ttg	agg	att	ctg	1025
	Phe	Arg	Ile	Phe	Lys	Phe	Ser	Arg	His	Ser	Gln	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	
		300					305					310					
60	ggc	tac	aca	ctc	aag	agc	tgt	gcc	tct	gag	ctg	ggc	ttt	ctc	ctc	ttt	1073
	Gly	Tyr	Thr	Leu	Lys	Ser	Cys	Ala	Ser	Glu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Phe	
	315					320					325					330	
65	tcc	cta	acc	atg	gcc	atc	atc	atc	ttt	gcc	act	gtc	atg	ttt	tat	gct	1121
	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ile	Ile	Ile	Phe	Ala	Thr	Val	Met	Phe	Tyr	Ala	
					335					340					345		
70	gag	aag	ggc	aca	aac	aag	acc	aac	ttt	aca	agc	atc	cct	gcg	gcc	ttc	1169
	Glu	Lys	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Thr	Ser	Ile	Pro	Ala	Ala	Phe	
				350					355					360			
75	tgg	tat	acc	att	gtc	acc	atg	acc	acg	ctt	ggc	tac	gga	gac	atg	gtg	1217
	Trp	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Gly	Asp	Met	Val	
			365					370					375				

DE 199 63 612 A 1

ccc agc acc att gct ggc aag att ttc ggg tcc atc tgc tca ctc agt Pro Ser Thr Ile Ala Gly Lys Ile Phe Gly Ser Ile Cys Ser Leu Ser 380 385 390	1265	
ggc gtc ttg gtc att gcc ctg cct gtg cca gtc att gtg tcc aac ttt Gly Val Leu Val Ile Ala Leu Pro Val Pro Val Ile Val S r Asn Phe 395 400 405 410	1313	5
agc cgc atc tac cac cag aac cag cgg gct gac aag cgc cga gca cag Ser Arg Ile Tyr His Gln Asn Gln Arg Ala Asp Lys Arg Arg Ala Gln 415 420 425	1361	10
cag aag gtg cgc ttg gca agg atc cgg ttg gca aag agt ggt acc acc Gln Lys Val Arg Leu Ala Arg Ile Arg Leu Ala Lys Ser Gly Thr Thr 430 435 440	1409	15
aat gcc ttc ctg cag tac aag cag aat ggg ggc ctt gag gac agc ggc Asn Ala Phe Leu Gln Tyr Lys Gln Asn Gly Gly Leu Glu Asp Ser Gly 445 450 455	1457	20
agt ggc gag gaa cag gct ctt tgt gtc agg aac cgt tct gcc ttt gaa Ser Gly Glu Glu Gln Ala Leu Cys Val Arg Asn Arg Ser Ala Phe Glu 460 465 470	1505	25
cag caa cat cac cac ttg ctg cac tgt cta gag aag aca acg tgc cat Gln Gln His His His Leu Leu His Cys Leu Glu Lys Thr Thr Cys His 475 480 485 490	1553	30
gag ttc aca gat gag ctc acc ttc agt gaa gcc ctg gga gcc gtc tcg Glu Phe Thr Asp Glu Leu Thr Phe Ser Glu Ala Leu Gly Ala Val Ser 495 500 505	1601	35
ccg ggt ggc cgc acc agc cgt agc acc tct gtg tct tcc cag cca gtg Pro Gly Gly Ser Thr Ser Arg Ser Thr Ser Val Ser Ser Gln Pro Val 510 515 520	1649	40
gga ccc gga agc ctg ctg tct tct tgc tgc cct cgc agg gcc aag cgc Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ser Ser Cys Cys Pro Arg Arg Ala Lys Arg 525 530 535	1697	45
cgc gcc atc cgc ctt gcc aac tcc act gcc tca gtc agc cgt ggc agc Arg Ala Ile Arg Leu Ala Asn Ser Thr Ala Ser Val Ser Arg Gly Ser 540 545 550	1745	50
atg cag gag ctg gac atg ctg gca ggg ctg cgc agg agc cat gcc cct Met Gln Glu Leu Asp Met Leu Ala Gly Leu Arg Arg Ser His Ala Pro 555 560 565 570	1793	55
cag agc cgc tcc agc ctc aat gcc aag ccc cat gac agc ctt gac ctg Gln Ser Arg Ser Ser Leu Asn Ala Lys Pro His Asp Ser Leu Asp Leu 575 580 585	1841	60
aac tgc gac agc cgg gac ttc gtg gct gcc att atc agc atc cct acc Asn Cys Asp Ser Arg Asp Phe Val Ala Ile Ile Ser Ile Pro Thr 590 595 600	1889	65
cct cct gcc aac acc cca gat gag agc caa cct tcc tcc cct ggc ggc Pro Pro Ala Asn Thr Pro Asp Glu Ser Gln Pro Ser Ser Pro Gly Gly 605 610 615	1937	
ggt ggc agg gcc ggc agc acc ctc agg aac tcc agc ctg ggt acc cct Gly Gly Arg Ala Gly Ser Thr Leu Arg Asn Ser Ser Leu Gly Thr Pro 620 625 630	1985	

DE 199 63 612 A 1

tgc ctc ttc ccc gag act gtc aag atc tca tcc ctg tgaggggtag 2031
 Cys Leu Phe Pro Glu Thr Val Lys Ile Ser Ser Leu
 635 640 645

5 gcctgctgat tcagagggtc ctcttcattt ttgggaactc ctttccaaag ccatattttt 2091
 gggaggcaga gaggggcagg cttgggcacc ccttctgccc cccccactga gaactatgca 2151
 atggagtttc atgaaatggt ccacatagtg gggaagtagc caggaaatga gaaacttcct 2211
 10 cccaccccag acattttttc tgggtgggagc tgaagcactg ggcttccaca ggcccctggc 2271
 ctcccttgccc tagcacactg ggactggccc cactctccca gctggactcc tgcattgctcc 2331
 15 tccccctggg ctctcagatg aaggcaaagc tttgatccga catctgagct ctagcctaag 2391
 aaggagagtt gagatttcct cctccctctg gctgggatat ggagctttgg aggttcagag 2451
 aagagaaccc tcacctctga tctggcctct acgagaggtc ctcattctcca tctggcccaa 2511
 20 caattcccag attctgaagc ttggaatgca aacacaggct tcatgggctg tggcctctgc 2571
 agcgacctgc catccccagg ccttgcttga ggggtcaggc tgcctctccc aacacacact 2631
 25 cagatagcac aaattctacc atccccctcc ctggctgctg gaaatggacc ccgcaaccct 2691
 gtcctctgct gggcccccag 2711

30 <210> 2
 <211> 646
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 35 Ala Ala Gly Leu Ala Thr Trp Leu Pro Phe Ala Arg Ala Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Trp Leu Pro Leu Ala Gln Gln Pro Leu Pro Pro Ala Pro Gly Val
 20 25 30
 40 Lys Ala Ser Arg Gly Asp Glu Val Leu Val Val Asn Val Ser Gly Arg
 35 40 45
 Arg Phe Glu Thr Trp Lys Asn Thr Leu Asp Arg Tyr Pro Asp Thr Leu
 50 55 60
 45 Leu Gly Ser Ser Glu Lys Glu Phe Phe Tyr Asp Ala Asp Ser Gly Glu
 65 70 75 80
 50 Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Asp Met Phe Arg His Val Leu Asn Phe
 85 90 95
 Tyr Arg Thr Gly Arg Leu His Cys Pro Arg Gln Glu Cys Ile Gln Ala
 100 105 110
 55 Phe Asp Glu Glu Leu Ala Phe Tyr Gly Leu Val Pro Glu Leu Val Gly
 115 120 125
 Asp Cys Cys Leu Glu Glu Tyr Arg Asp Arg Lys Lys Glu Asn Ala Glu
 130 135 140
 60 Arg Leu Ala Glu Asp Glu Glu Ala Glu Gln Ala Gly Asp Gly Pro Ala
 145 150 155 160

65

DE 199 63 612 A 1

Leu	Pro	Ala	Gly	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Trp	Arg	Ala	Phe	Glu		
				165					170					175			
Asn	Pro	His	Thr	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Phe	Tyr	Tyr	Val	Thr	Gly		5
			180					185					190				
Phe	Phe	Ile	Ala	Val	Ser	Val	Ile	Ala	Asn	Val	Val	Glu	Thr	Ile	Pro		
		195					200					205					
Cys	Arg	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	Glu	Gln	Pro	Cys	Gly	Glu		10
	210					215					220						
Arg	Phe	Pro	Gln	Ala	Phe	Phe	Cys	Met	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Leu	Ile		
	225				230					235					240		
Phe	Thr	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Leu	Phe	Ala	Ala	Pro	Ser	Arg	Cys		15
				245					250					255			
Arg	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Met	Ser	Leu	Ile	Asp	Val	Val	Ala	Ile	Leu		
			260					265					270				20
Pro	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Val	Pro	Lys	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly		
		275					280					285					
Ala	Phe	Val	Thr	Leu	Arg	Val	Phe	Arg	Val	Phe	Arg	Ile	Phe	Lys	Phe		25
	290					295					300						
Ser	Arg	His	Ser	Gln	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Gly	Tyr	Thr	Leu	Lys	Ser		
	305				310					315					320		
Cys	Ala	Ser	Glu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Thr	Met	Ala	Ile		30
				325					330					335			
Ile	Ile	Phe	Ala	Thr	Val	Met	Phe	Tyr	Ala	Glu	Lys	Gly	Thr	Asn	Lys		
			340					345					350				
Thr	Asn	Phe	Thr	Ser	Ile	Pro	Ala	Ala	Phe	Trp	Tyr	Thr	Ile	Val	Thr		35
		355					360					365					
Met	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Gly	Asp	Met	Val	Pro	Ser	Thr	Ile	Ala	Gly		
		370				375					380						40
Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Ser	Gly	Val	Leu	Val	Ile	Ala		
	385				390					395					400		
Leu	Pro	Val	Pro	Val	Ile	Val	Ser	Asn	Phe	Ser	Arg	Ile	Tyr	His	Gln		45
				405					410					415			
Asn	Gln	Arg	Ala	Asp	Lys	Arg	Arg	Ala	Gln	Gln	Lys	Val	Arg	Leu	Ala		
			420					425					430				
Arg	Ile	Arg	Leu	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Ala	Phe	Leu	Gln	Tyr		50
			435				440					445					
Lys	Gln	Asn	Gly	Gly	Leu	Glu	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Glu	Gln	Ala		
		450				455					460						
Leu	Cys	Val	Arg	Asn	Arg	Ser	Ala	Phe	Glu	Gln	Gln	His	His	His	Leu		55
	465				470					475					480		
Leu	His	Cys	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Cys	His	Glu	Phe	Thr	Asp	Glu	Leu		60
				485					490					495			
																	65

DE 199 63 612 A 1

Thr Phe Ser Glu Ala Leu Gly Ala Val Ser Pro Gly Gly Arg Thr Ser
 500 505 510
 5 Arg Ser Thr Ser Val Ser Ser Gln Pro Val Gly Pro Gly Ser Leu Leu
 515 520 525
 Ser Ser Cys Cys Pro Arg Arg Ala Lys Arg Arg Ala Ile Arg Leu Ala
 530 535 540
 10 Asn Ser Thr Ala Ser Val Ser Arg Gly Ser Met Gln Glu Leu Asp Met
 545 550 555 560
 Leu Ala Gly Leu Arg Arg Ser His Ala Pro Gln Ser Arg Ser Ser Leu
 565 570 575
 15 Asn Ala Lys Pro His Asp Ser Leu Asp Leu Asn Cys Asp Ser Arg Asp
 580 585 590
 Phe Val Ala Ala Ile Ile Ser Ile Pro Thr Pro Pro Ala Asn Thr Pro
 595 600 605
 20 Asp Glu Ser Gln Pro Ser Ser Pro Gly Gly Gly Gly Arg Ala Gly Ser
 610 615 620
 25 Thr Leu Arg Asn Ser Ser Leu Gly Thr Pro Cys Leu Phe Pro Glu Thr
 625 630 635 640
 Val Lys Ile Ser Ser Leu
 645
 30
 <210> 3
 <211> 2351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (433)..(2319)
 <223> Offener Leserahmen fuer hKv4.2 alpha-Untereinheit
 40
 <400> 3
 gaattctatt gggtgactct cgttcgtctt ctctatccta cactccacat actgacccta 60
 tattatccag actgtgccgg ggagaaatca aaaacacctg tttgaagaaa cggctgcacc 120
 45 tgtgtgctta tttgtgccag aggggtggcct agcccacctg caggaagaga tttggctggg 180
 ttctgttgag ggtgattgtt aggacgttgt attttgttgc cattattcca aatacctgtc 240
 50 ttggagggaa agttgccctt ctgagaactg tgactttacc aggagcccta tcttgggaata 300
 agagttacac ctctggacca cgtttctcac tagtactttg cttgactgga ggaagtgggt 360
 gacttttggc tgcttcggtg acccattgta gacgcctcgt tacccttctt ccttccgctt 420
 55 caagtaatca tg gcg gcg ggg gtg gca gcg tgg ctg cct ttt gca agg gca 471
 Ala Ala Gly Val Ala Ala Trp Leu Pro Phe Ala Arg Ala
 1 5 10
 60 gcg gct atc ggg tgg atg cct gtg gcc tcg ggg cct atg ccg gct ccc 519
 Ala Ala Ile Gly Trp Met Pro Val Ala Ser Gly Pro Met Pro Ala Pro
 15 20 25

65

DE 199 63 612 A 1

ccg agg cag gag agg aaa agg acc caa gat gct ctc att gtg ctg aat Pro Arg Gln Glu Arg Lys Arg Thr Gln Asp Ala Leu Ile Val Leu Asn 30 35 40 45	567	
gtg agt ggc acc cgc ttc cag acg tgg cag gac acc ctg gaa cgt tac Val Ser Gly Thr Arg Phe Gln Thr Trp Gln Asp Thr Leu Glu Arg Tyr 50 55 60	615	5
cca gac act cta ctg ggc agt tct gag agg gac ttt ttc tac cac cca Pro Asp Thr Leu Leu Gly Ser Ser Glu Arg Asp Phe Phe Tyr His Pro 65 70 75	663	10
gaa act cag cag tat ttc ttt gac cgt gac cca gac atc ttc cgc cac Glu Thr Gln Gln Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Asp Ile Phe Arg His 80 85 90	711	15
atc ctg aat ttc tac cgc act ggg aag ctc cac tat cct cgc cac gag Ile Leu Asn Phe Tyr Arg Thr Gly Lys Leu His Tyr Pro Arg His Glu 95 100 105	759	
tgc atc tct gct tac gat gaa gaa ctg gcc ttc ttt ggc ctc atc ccg Cys Ile Ser Ala Tyr Asp Glu Glu Leu Ala Phe Phe Gly Leu Ile Pro 110 115 120 125	807	20
gaa atc atc ggc gac tgc tgt tat gag gag tac aag gat cgc agg cga Glu Ile Ile Gly Asp Cys Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Asp Arg Arg Arg 130 135 140	855	25
gag aac gcc gag cgc ctg cag gac gac gcg gat acc gac acc gct ggg Glu Asn Ala Glu Arg Leu Gln Asp Asp Ala Asp Thr Asp Thr Ala Gly 145 150 155	903	30
gag agc gcc ttg ccc acc atg act gca agg cag agg gtc tgg agg gcc Glu Ser Ala Leu Pro Thr Met Thr Ala Arg Gln Arg Val Trp Arg Ala 160 165 170	951	35
ttc gag aac ccc cac acc agc acg atg gcc ctg gtg ttc tac tat gtc Phe Glu Asn Pro His Thr Ser Thr Met Ala Leu Val Phe Tyr Tyr Val 175 180 185	999	
acg ggg ttt ttc att gcc gtc tct gtc atc gcg aat gtg gtg gaa aca Thr Gly Phe Phe Ile Ala Val Ser Val Ile Ala Asn Val Val Glu Thr 190 195 200 205	1047	40
gtg ccg tgc gga tca agc cca ggt cac att aaa gaa ctg ccc tgt gga Val Pro Cys Gly Ser Ser Pro Gly His Ile Lys Glu Leu Pro Cys Gly 210 215 220	1095	45
gag cgg tat gct gtg gcc ttc ttc tgc ttg gac acg gcc tgc gtc atg Glu Arg Tyr Ala Val Ala Phe Phe Cys Leu Asp Thr Ala Cys Val Met 225 230 235	1143	50
atc ttc aca gtt gag tat ttg ctt cgc ctg gct gca gcg cct agt cgt Ile Phe Thr Val Glu Tyr Leu Leu Arg Leu Ala Ala Ala Pro Ser Arg 240 245 250	1191	
tac cgt ttt gtg cgt agt gtc atg agt atc atc gac gtg gtg gcc atc Tyr Arg Phe Val Arg Ser Val Met Ser Ile Ile Asp Val Val Ala Ile 255 260 265	1239	55
ctg cct tat tac att ggg ctg gtg atg aca gac aat gag gac gtc agc Leu Pro Tyr Tyr Ile Gly Leu Val Met Thr Asp Asn Glu Asp Val Ser 270 275 280 285	1287	60

65

DE 199 63 612 A 1

	gga gcc ttt gtc aca ctc cga gtc ttc cgg gtc ttc agg atc ttt aag	1335
	Gly Ala Phe Val Thr Leu Arg Val Phe Arg Val Phe Arg Ile Phe Lys	
	290 295 300	
5	ttt tcc cgc cac tct caa ggc ctg cgc atc ctg ggg tac aca ctg aag	1383
	Phe Ser Arg His Ser Gln Gly Leu Arg Ile Leu Gly Tyr Thr Leu Lys	
	305 310 315	
10	agt tgt gcc tca gaa ttg ggc ttc ttg ctt ttc tgg ctc acc atg gct	1431
	Ser Cys Ala Ser Glu Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ser Leu Thr Met Ala	
	320 325 330	
15	atc atc atc ttc gct aca gtt atg ttc tac gca gag aag ggg tct tcg	1479
	Ile Ile Ile Phe Ala Thr Val Met Phe Tyr Ala Glu Lys Gly Ser Ser	
	335 340 345	
	gct agc aag ttc acc agc atc cct gca gcc ttc tgg tat acc atc gtc	1527
	Ala Ser Lys Phe Thr Ser Ile Pro Ala Ala Phe Trp Tyr Thr Ile Val	
	350 355 360 365	
20	acc atg aca aca cta ggg tat ggt gac atg gtg cca aaa acc ata gca	1575
	Thr Met Thr Thr Leu Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Lys Thr Ile Ala	
	370 375 380	
25	ggg aag att ttt ggt tct atc tgt tcg ctg agt ggg gtc ttg gtc att	1623
	Gly Lys Ile Phe Gly Ser Ile Cys Ser Leu Ser Gly Val Leu Val Ile	
	385 390 395	
30	gct cta cct gtt ccg gtg att gta tcc aac ttc agt cgc atc tac cac	1671
	Ala Leu Pro Val Pro Val Ile Val Ser Asn Phe Ser Arg Ile Tyr His	
	400 405 410	
	cag aat caa cga gca gac aaa cga agg gca caa aag aaa gct aga ctg	1719
	Gln Asn Gln Arg Ala Asp Lys Arg Arg Ala Gln Lys Lys Ala Arg Leu	
	415 420 425	
35	gcc agg atc cgg gca gcc aaa agc gga agc gca aat gct tac atg cag	1767
	Ala Arg Ile Arg Ala Ala Lys Ser Gly Ser Ala Asn Ala Tyr Met Gln	
	430 435 440 445	
40	agc aaa cgg aat ggt tta ctc agt aat cag ctg cag tcc tca gag gat	1815
	Ser Lys Arg Asn Gly Leu Leu Ser Asn Gln Leu Gln Ser Ser Glu Asp	
	450 455 460	
45	gag cag gct ttt gtt agc aaa tcc ggc tcc agc ttt gaa acc cag cac	1863
	Glu Gln Ala Phe Val Ser Lys Ser Gly Ser Ser Phe Glu Thr Gln His	
	465 470 475	
	cac cac ctg ctt cac tgc ctg gaa aaa acc acg aat cac gag ttt gtg	1911
	His His Leu Leu His Cys Leu Glu Lys Thr Thr Asn His Glu Phe Val	
	480 485 490	
50	gac gaa caa gtc ttt gaa gaa agc tgc atg gaa gtt gca act gtt aat	1959
	Asp Glu Gln Val Phe Glu Glu Ser Cys Met Glu Val Ala Thr Val Asn	
	495 500 505	
55	cgt cct tca agt cac agt cct tca ctg tct tca caa caa gga gtc acc	2007
	Arg Pro Ser Ser His Ser Pro Ser Leu Ser Ser Gln Gln Gly Val Thr	
	510 515 520 525	
60	agc acc tgc tgt tca cga cga cac aaa aaa act ttt cgc atc cca aat	2055
	Ser Thr Cys Cys Ser Arg Arg His Lys Lys Thr Phe Arg Ile Pro Asn	
	530 535 540	

65

DE 199 63 612 A 1

gcc aat gta tca gga agc cat caa ggt agt ata caa gaa ctc agc acg Ala Asn Val Ser Gly Ser His Gln Gly Ser Ile Gln Glu Leu Ser Thr 545 550 555	2103	
att cag atc aga tgt gtg gag aga aca cct ctg tct aac agc cga tcc Ile Gln Ile Arg Cys Val Glu Arg Thr Pro Leu Ser Asn Ser Arg Ser 560 565 570	2151	5
agt tta aat gcc aaa atg gaa gag tgt gtt aaa cta aac tgt gaa caa Ser Leu Asn Ala Lys Met Glu Glu Cys Val Lys Leu Asn Cys Glu Gln 575 580 585	2199	10
cct tat gtg act aca gca ata ata agc atc cca aca cct cca gta acc Pro Tyr Val Thr Thr Ala Ile Ile Ser Ile Pro Thr Pro Pro Val Thr 590 595 600 605	2247	15
aca cca gaa gga gac gat agg cca gaa tcc cct gag tac tca gga gga Thr Pro Glu Gly Asp Asp Arg Pro Glu Ser Pro Glu Tyr Ser Gly Gly 610 615 620	2295	20
aat att gtc aga gtt tct gct ttg taagacaatt ggaataaggt ctaagagaat Asn Ile Val Arg Val Ser Ala Leu 625	2349	
tc	2351	25
<210> 4 <211> 629 <212> PRT <213> Homo sapiens		30
<400> 4 Ala Ala Gly Val Ala Ala Trp Leu Pro Phe Ala Arg Ala Ala Ala Ile 1 5 10 15		35
Gly Trp Met Pro Val Ala Ser Gly Pro Met Pro Ala Pro Pro Arg Gln 20 25 30		
Glu Arg Lys Arg Thr Gln Asp Ala Leu Ile Val Leu Asn Val Ser Gly 35 40 45		40
Thr Arg Phe Gln Thr Trp Gln Asp Thr Leu Glu Arg Tyr Pro Asp Thr 50 55 60		
Leu Leu Gly Ser Ser Glu Arg Asp Phe Phe Tyr His Pro Glu Thr Gln 65 70 75 80		45
Gln Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Asp Ile Phe Arg His Ile Leu Asn 85 90 95		
Phe Tyr Arg Thr Gly Lys Leu His Tyr Pro Arg His Glu Cys Ile Ser 100 105 110		50
Ala Tyr Asp Glu Glu Leu Ala Phe Phe Gly Leu Ile Pro Glu Ile Ile 115 120 125		55
Gly Asp Cys Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Asp Arg Arg Arg Glu Asn Ala 130 135 140		
Glu Arg Leu Gln Asp Asp Ala Asp Thr Asp Thr Ala Gly Glu Ser Ala 145 150 155 160		60
		65

DE 199 63 612 A 1

Leu Pro Thr Met Thr Ala Arg Gln Arg Val Trp Arg Ala Phe Glu Asn
 165 170 175
 5 Pro His Thr Ser Thr Met Ala Leu Val Phe Tyr Tyr Val Thr Gly Phe
 180 185 190
 Phe Ile Ala Val Ser Val Ile Ala Asn Val Val Glu Thr Val Pro Cys
 195 200 205
 10 Gly Ser Ser Pro Gly His Ile Lys Glu Leu Pro Cys Gly Glu Arg Tyr
 210 215 220
 Ala Val Ala Phe Phe Cys Leu Asp Thr Ala Cys Val Met Ile Phe Thr
 225 230 235 240
 15 Val Glu Tyr Leu Leu Arg Leu Ala Ala Ala Pro Ser Arg Tyr Arg Phe
 245 250 255
 Val Arg Ser Val Met Ser Ile Ile Asp Val Val Ala Ile Leu Pro Tyr
 260 265 270
 Tyr Ile Gly Leu Val Met Thr Asp Asn Glu Asp Val Ser Gly Ala Phe
 275 280 285
 25 Val Thr Leu Arg Val Phe Arg Val Phe Arg Ile Phe Lys Phe Ser Arg
 290 295 300
 His Ser Gln Gly Leu Arg Ile Leu Gly Tyr Thr Leu Lys Ser Cys Ala
 305 310 315 320
 30 Ser Glu Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ser Leu Thr Met Ala Ile Ile Ile
 325 330 335
 Phe Ala Thr Val Met Phe Tyr Ala Glu Lys Gly Ser Ser Ala Ser Lys
 340 345 350
 35 Phe Thr Ser Ile Pro Ala Ala Phe Trp Tyr Thr Ile Val Thr Met Thr
 355 360 365
 Thr Leu Gly Tyr Gly Asp Met Val Pro Lys Thr Ile Ala Gly Lys Ile
 370 375 380
 40 Phe Gly Ser Ile Cys Ser Leu Ser Gly Val Leu Val Ile Ala Leu Pro
 385 390 395 400
 45 Val Pro Val Ile Val Ser Asn Phe Ser Arg Ile Tyr His Gln Asn Gln
 405 410 415
 Arg Ala Asp Lys Arg Arg Ala Gln Lys Lys Ala Arg Leu Ala Arg Ile
 420 425 430
 50 Arg Ala Ala Lys Ser Gly Ser Ala Asn Ala Tyr Met Gln Ser Lys Arg
 435 440 445
 Asn Gly Leu Leu Ser Asn Gln Leu Gln Ser Ser Glu Asp Glu Gln Ala
 450 455 460
 55 Phe Val Ser Lys Ser Gly Ser Ser Phe Glu Thr Gln His His His Leu
 465 470 475 480
 Leu His Cys Leu Glu Lys Thr Thr Asn His Glu Phe Val Asp Glu Gln
 485 490 495
 60
 65

DE 199 63 612 A 1

Val Phe Glu Glu Ser Cys Met Glu Val Ala Thr Val Asn Arg Pro Ser	
500 505 510	
Ser His Ser Pro Ser Leu Ser Ser Gln Gln Gly Val Thr Ser Thr Cys	5
515 520 525	
Cys Ser Arg Arg His Lys Lys Thr Phe Arg Ile Pro Asn Ala Asn Val	
530 535 540	
Ser Gly Ser His Gln Gly Ser Ile Gln Glu Leu Ser Thr Ile Gln Ile	10
545 550 555 560	
Arg Cys Val Glu Arg Thr Pro Leu Ser Asn Ser Arg Ser Ser Leu Asn	
565 570 575	
Ala Lys Met Glu Glu Cys Val Lys Leu Asn Cys Glu Gln Pro Tyr Val	15
580 585 590	
Thr Thr Ala Ile Ile Ser Ile Pro Thr Pro Pro Val Thr Thr Pro Glu	
595 600 605	20
Gly Asp Asp Arg Pro Glu Ser Pro Glu Tyr Ser Gly Gly Asn Ile Val	
610 615 620	
Arg Val Ser Ala Leu	25
625	
<210> 5	
<211> 2033	
<212> DNA	30
<213> Homo sapiens	
<220>	
<223> Exon 1 des humanen KCND1-Gens	35
<400> 5	
tggatgcccc agtctcctct ccaccactgc aaaggaattc caggctcttc tgccttcctt 60	
gaagactctt gagagtgcag agaattcccc aggtgtttct tggccctctt agacgcccc 120	
agacacctct caggcacagg ctgactcctt tagaatcatc tcagtctctc taaacctctc 180	40
ctcagctcct tcttggcccc atccccacac cctttttctg ctcttctcca tgtccccaag 240	
gcccttctca gtccttcaga acattgcccc ggccctctct aggttctgta aatgtcccc 300	45
agactccttc ccatctcttt agttcttctt cctggttcct cttggcctct ctagacaccc 360	
ccagtttctt tgtttgggtg gctcaagggtg tctccaagcc cccaccatcc tggagacagc 420	
cacattctcc taaacgccac cctcactaag tctccctggg cttggggagt ggcacgatgg 480	50
cggcaggcct ggccacgtgg ctgccttttg ctcgggcagc agcagtgggc tggctgcccc 540	
tggcccagca accctgccc cgggcaccgg gggtgaaggc atctcgagga gatgagggtc 600	55
tgggtggtgaa cgtgagcgga cggcgctttg agacttgga gaatacgctg gaccgctacc 660	
cagacacctt gctgggcagc tcggagaagg aattcttcta cgatgctgac tcaggcgagt 720	
acttcttcga tcgcgacctt gacatgttcc gccatgtgct gaacttctac cgaacggggc 780	60
ggctgcattg cccacggcag gagtgcaccc aggccttcga cgaagagctg gctttctacg 840	
	65

DE 199 63 612 A 1

gcctggttcc cgagctagtc ggtgactgct gccttgaaga gtatcgggac cgaaagaagg 900
 agaatgccga ggccttgga gaggatgagg aggcagagca ggccggggac ggcccagccc 960
 5 tgccagcagg cagctccctg cggcagcggc tctggcgggc cttcgagaat ccacacacga 1020
 gcaccgcagc cctcgttttc tactatgtga cgggcttctt catcgccgtg tcggtcatcg 1080
 ccaatgtggt ggagaccatc ccatgccgcg gctctgcacg caggctctca agggagcagc 1140
 10 cctgtggcga acgcttccca caggcctttt tctgcatgga cacagcctgt gtactcatat 1200
 tcacaggtga atacctcctg cggctgtttg ccgccccag ccgttgccgc ttcctgcgga 1260
 gtgtcatgag cctcatcgac gtggtggcca tcctgcccta ctacattggg cttttggtgc 1320
 ccaagaacga cgatgtctct ggcgctttg tcacctgcg tgtgttccgg gtgtttcgca 1380
 tcttcaagtt ctcaggcac tcacagggt tgaggattct gggctacaca ctcaagagct 1440
 20 gtgcctctga gctgggcttt ctcctctttt ccctaaccat ggccatcatc atctttgcca 1500
 ctgtcatgtt ttatgctgag aagggcacaa acaagaccaa ctttacaagc atccctgcgg 1560
 ccttctggta taccattgtc accatgacca cgcttgggtg agtgtggact ctgcgttggg 1620
 ggctgcccga ttacactcac cctttctgta aaattaggaa gtttaaagga atgatctctt 1680
 tctttctttc tttttaaatg gagtcttact ctgtcgccca ggctggagta cagtggcaag 1740
 30 atctcagctc actacaacct ctgcttcctg gggtcaagtg attctccagc ctcagactcc 1800
 caagtagctg ggattacagg tacacgccac catgcccagc taatttttgt atttttagta 1860
 gagacggggg ttcaccgcgt tggccagggt ggtctcaaac tcctgacctc aggtgatccg 1920
 35 ccgcttggcc gccaaagtgc cgggattaca ggtgtgagcc accgcgcctg gctcttctct 1980
 ttgagctcag ttgctcatct gacaactgag agctgactat ctcagatcct cag 2033

40 <210> 6
 <211> 1400
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 45 <220>
 <223> Exone 2-5 des humanen KCND1-Gens

<400> 6
 50 taggcaggcc attctcactt ggccaccagc ctttttacag agcaagaaac tgagggactc 60
 agaaggtttg agtgccctggc cagggtcaca gagctagtcc ggattagatg ggatggagtg 120
 ggggactgaa aggtaggtgg gcacttttcc tgaccttggc ctacctccc tcgctccagc 180
 55 tacggagaca tgggtgccag caccattgct ggcaagattt tcgggtccat ctgctcactc 240
 agtggcgtct tggctcattgc cctgcctgtg ccagtcattg tgtccaactt tagccgcata 300
 taccaccaga accagcgggc tgacaagcgc cgagcacagc aggtaaccgc actttccatc 360
 60 cgagcacctc ctactcccca caccacaagc cagtctactt tggggcttac ccacctgacc 420

65

ttttatctcc tctctctgca gaaggtgcgc ttggcaagga tccgattggc aaagagtggg 480
 accaccaatg ccttcctgca gtacaagcag aatggggggc ttgaggtggg tcggggcctg 540
 gatagggttg gggtagacca taacggggag gaaggtgctg cccttatcgc tctgctccat 600
 ctactccagg acagcggcag tggcgaggaa caggctcttt gtgtcaggaa ccgttctgcc 660
 tttgaacagc aacatcacca cttgctgcac tgtctagaga agacaacggt gaggcctaata 720
 gtgaggtgat atagcagaat agaggggggc cctctgcggc catgccagct ctctcccttg 780
 gatgggaggc tctactacaa ttgtggaaat cacacagagc ttcctggaag aggctacagg 840
 agagccaagc cttgaagaat gggcaaggga aggggaaggag gaacaatgtc cagaaaggag 900
 aaaacagcct gagcaaaggc ttgaggggtgg gatcagctcc catgggatgc cccgtgaccc 960
 tgcttccctt ctgccatagt gccatgagtt cacagatgag ctcaccttca gtgaagccct 1020
 gggagccgtc tcgccgggtg gccgcaccag ccgtagcacc tctgtgtctt cccagccagt 1080
 gggacccgga agcctgctgt cttcttgctg ccctcgcagg gccaaagcgc gcgccatccg 1140
 ccttgccaac tccactgcct cagtcagccg tggcagcatg caggagctgg acatgctggc 1200
 agggctgcgc aggagccatg cccctcagag gtaagcagcc ctccctacctg ctagccacac 1260
 ctgggggaagc tcagagctta gaccagtagc tctgagattt cataactcca ggcctagcaa 1320
 gtcaagctcg aacccaaacc cctccatgct ggatgcttgg gcttatcttg tctggaactc 1380
 attcttcatc cattcttttt 1400

<210> 7
 <211> 529
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Exon 6 des humanen KCND1-Gens

<400> 7
 ctggtattac aggcacacac caccacgccc agctaattgt tgtattttta gtagagatga 60
 ggttttgcca tgttaccag gctagtctcg aactcctgac ctcagatgat ccactcacct 120
 cggcctccca aagtgtgagg attacaggca tgagccaccg caccggcct aagataactt 180
 ttttaagagc ttccatcttc tccacccttg tccacagccg ctccagcctc aatgccaaagc 240
 cccatgacag ccttgacctg aactgcgaca gccgggactt cgtggctgcc attatcagca 300
 tccctacccc tccctgccaac accccagatg agagccaacc ttcctccctt ggccggcggtg 360
 gcagggccgg cagcaccctc aggaactcca gcctgggtac cccttgccctc tccccgaga 420
 ctgtcaagat ctcatccctg tgaggggtag gcctgctgat tcagagggtc ctcttcattt 480
 ttgggaactc ctttccaaag ccatattttt ggagggcaga gaggggcag 529

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: sense-Primer
hg427
10 <400> 8
agtatcctct tccagtaac 19

<210> 9
15 <211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Description of Artificial Sequence:
antisense-Primer hg428

<400> 9
gccgttggtt gacattgga 19
25

<210> 10
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
30

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' Insert
screening amplimer (Primer zum Sequenzieren)
35 <400> 10
gactcctgga gcccg 15

<210> 11
40 <211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Description of Artificial Sequence: 3' Insert
screening amplimer (Primer zum Sequenzieren)

<400> 11
ggtagcgacc ggcgc 15
50

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
55

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: sense-Primer
h41-1 (PCR-Primer)
60 <400> 12
agccccacc atcctggaga 20

65

<210> 13		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		5
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: antisense-Primer h41-2 (PCR-Primer)		
<400> 13		10
ctggggggccc agcagaggac	20	
<210> 14		
<211> 19		15
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: T7 (Primer zum Sequenzieren)		20
<400> 14		
ggaaacagct atgaccatg	19	
		25
<210> 15		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: sense-Primer h41-3 (PCR-Primer und Primer zum Sequenzieren)		
<400> 15		35
gacttggaag aatacgctgg ac	22	
<210> 16		
<211> 22		40
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: h41-4 (Primer zum Sequenzieren)		45
<400> 16		
aatcttgcca gcaatggtgc tg	22	
		50
<210> 17		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		55
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: h41-5 (Primer zum Sequenzieren)		
<400> 17		60
catcatcatc tttgccactg tc	22	
		65

<210> 18
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: h41-6 (Primer
 zum Sequenzieren)
 10 <400> 18 22
 tacaagcaga atgggggcct tg

 <210> 19
 15 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 20 <223> Description of Artificial Sequence: h41-7 (Primer
 zum Sequenzieren)

 <400> 19 21
 atgcaggagc tggacatgct g
 25
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: h41-8
 (PCR-Primer)
 35 <400> 20 21
 tcatgacact ccgcaggaag c

 <210> 21
 40 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (433)..(1083)
 <223> Teil der kodierenden Region, der den Aminosaeuren
 1 bis 217 von hKv4.2 entspricht

 <400> 21
 50 gaattctatt ggggtgactct cgttcgtctt ctctatccta cactccacat actgacccta 60
 tattatccag actgtgccgg ggagaaatca aaaacacctg tttgaagaaa cggtgcacc 120
 tgtgtgctta tttgtgccag aggggtggcct agcccacctg caggaagaga tttggctggg 180
 55 ttctgttgag ggtgattgtt aggacgttgt attttgttgc cattattcca aataacctgtc 240
 ttggagggaa agttgccctt ctgagaactg tgactttacc aggagcccta tcttgggaata 300
 60 agagttacac ctctggacca cgtttctcac tagtactttg cttgactgga ggaagtgggt 360
 gacttttggc tgcttcggtg acccattgta gacgcctcgt tacccttctt ccttccgctt 420
 65

DE 199 63 612 A 1

caagtaatca tg gcg gcg ggg gtg gca gcg tgg ctg cct ttt gca agg gca 471
 Ala Ala Gly Val Ala Ala Trp Leu Pro Phe Ala Arg Ala
 1 5 10

gcg gct atc ggg tgg atg cct gtg gcc tcg ggg cct atg ccg gct ccc 519
 Ala Ala Ile Gly Trp Met Pro Val Ala Ser Gly Pro Met Pro Ala Pro
 15 20 25

ccg agg cag gag agg aaa agg acc caa gat gct ctc att gtg ctg aat 567
 Pro Arg Gln Glu Arg Lys Arg Thr Gln Asp Ala Leu Ile Val Leu Asn
 30 35 40 45

gtg agt ggc acc cgc ttc cag acg tgg cag gac acc ctg gaa cgt tac 615
 Val Ser Gly Thr Arg Phe Gln Thr Trp Gln Asp Thr Leu Glu Arg Tyr
 50 55 60

cca gac act cta ctg ggc agt tct gag agg gac ttt ttc tac cac cca 663
 Pro Asp Thr Leu Leu Gly Ser Ser Glu Arg Asp Phe Phe Tyr His Pro
 65 70 75

gaa act cag cag tat ttc ttt gac cgt gac cca gac atc ttc cgc cac 711
 Glu Thr Gln Gln Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Asp Ile Phe Arg His
 80 85 90

atc ctg aat ttc tac cgc act ggg aag ctc cac tat cct cgc cac gag 759
 Ile Leu Asn Phe Tyr Arg Thr Gly Lys Leu His Tyr Pro Arg His Glu
 95 100 105

tgc atc tct gct tac gat gaa gaa ctg gcc ttc ttt ggc ctc atc ccg 807
 Cys Ile Ser Ala Tyr Asp Glu Glu Leu Ala Phe Phe Gly Leu Ile Pro
 110 115 120 125

gaa atc atc ggc gac tgc tgt tat gag gag tac aag gat cgc agg cga 855
 Glu Ile Ile Gly Asp Cys Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Asp Arg Arg
 130 135 140

gag aac gcc gag cgc ctg cag gac gac gcg gat acc gac acc gct ggg 903
 Glu Asn Ala Glu Arg Leu Gln Asp Asp Ala Asp Thr Asp Thr Ala Gly
 145 150 155

gag agc gcc ttg ccc acc atg act gca agg cag agg gtc tgg agg gcc 951
 Glu Ser Ala Leu Pro Thr Met Thr Ala Arg Gln Arg Val Trp Arg Ala
 160 165 170

ttc gag aac ccc cac acc agc acg atg gcc ctg gtg ttc tac tat gtc 999
 Phe Glu Asn Pro His Thr Ser Thr Met Ala Leu Val Phe Tyr Tyr Val
 175 180 185

acg ggg ttt ttc att gcc gtc tct gtc atc gcg aat gtg gtg gaa aca 1047
 Thr Gly Phe Phe Ile Ala Val Ser Val Ile Ala Asn Val Val Glu Thr
 190 195 200 205

gtg ccg tgc gga tca agc cca ggt cac att aaa gaa 1083
 Val Pro Cys Gly Ser Ser Pro Gly His Ile Lys Glu
 210 215

<210> 22
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 22
 Ala Ala Gly Val Ala Ala Trp Leu Pro Phe Ala Arg Ala Ala Ala Ile
 1 5 10 15
 10 Gly Trp Met Pro Val Ala Ser Gly Pro Met Pro Ala Pro Pro Arg Gln
 20 25 30
 Glu Arg Lys Arg Thr Gln Asp Ala Leu Ile Val Leu Asn Val Ser Gly
 35 40 45
 15 Thr Arg Phe Gln Thr Trp Gln Asp Thr Leu Glu Arg Tyr Pro Asp Thr
 50 55 60
 Leu Leu Gly Ser Ser Glu Arg Asp Phe Phe Tyr His Pro Glu Thr Gln
 20 65 70 75 80
 Gln Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Asp Ile Phe Arg His Ile Leu Asn
 85 90 95
 25 Phe Tyr Arg Thr Gly Lys Leu His Tyr Pro Arg His Glu Cys Ile Ser
 100 105 110
 Ala Tyr Asp Glu Glu Leu Ala Phe Phe Gly Leu Ile Pro Glu Ile Ile
 115 120 125
 30 Gly Asp Cys Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Asp Arg Arg Arg Glu Asn Ala
 130 135 140
 Glu Arg Leu Gln Asp Asp Ala Asp Thr Asp Thr Ala Gly Glu Ser Ala
 145 150 155 160
 35 Leu Pro Thr Met Thr Ala Arg Gln Arg Val Trp Arg Ala Phe Glu Asn
 165 170 175
 Pro His Thr Ser Thr Met Ala Leu Val Phe Tyr Tyr Val Thr Gly Phe
 180 185 190
 40 Phe Ile Ala Val Ser Val Ile Ala Asn Val Val Glu Thr Val Pro Cys
 195 200 205
 45 Gly Ser Ser Pro Gly His Ile Lys Glu
 210 215

<210> 23
 <211> 17
 50 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 55 <223> Description of Artificial Sequence: M13 (Primer
 zum Sequenzieren)

<400> 23
 gtaaaacgac ggccagt

17

60

65

DE 199 63 612 A 1

<210> 24		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		5
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Reverse (Primer zum Sequenzieren)		
<400> 24		10
ggaaacagct atgaccatg	19	
<210> 25		
<211> 20		15
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: T3 (Primer zum Sequenzieren)		20
<400> 25		
aattaaccct cactaaaggg	20	25
<210> 26		
<211> 5		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Kozak (Zum Einbau in Seam1)		
<400> 26		35
ccacc	5	
<210> 27		
<211> 35		40
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: h42koz		45
<400> 27		
attaagcttc caccatggcg gcgggggtgg cagcg	35	
<210> 28		50
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		55
<223> Description of Artificial Sequence: h423		
<400> 28		
acatagtaga acaccagggc c	21	60
		65

<210> 29
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <223> Kv 4.3
 <400> 29
 10 Met Ala Ala Gly Val Ala Ala Trp Leu Pro Phe Ala Arg Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ile Gly Trp Met Pro Val Ala Asn Cys Pro Met Pro Leu Ala Pro Ala
 20 25 30
 15 Asp Lys Asn Lys Arg Gln Asp Glu Leu Ile Val Leu Asn Val Ser Gly
 35 40 45
 Arg Arg Phe Gln Thr Trp Arg Thr Thr Leu Glu Arg Tyr Pro Asp Thr
 50 55 60
 20 Leu Leu Gly Ser Thr Glu Lys Glu Phe Phe Phe Asn Glu Asp Thr Lys
 65 70 75 80
 25 Glu Tyr Phe Phe Asp Arg Asp Pro Glu Val Phe Arg Cys Val Leu Asn
 85 90 95
 Phe Tyr Arg Thr Gly Lys Leu His Tyr Pro Arg Tyr Glu Cys Ile Ser
 100 105 110
 30 Ala Tyr Asp Asp Glu Leu Ala Phe Tyr Gly Ile Leu Pro Glu Ile Ile
 115 120 125
 Gly Asp Cys Cys Tyr Glu Glu Tyr Lys Asp Arg Lys Arg Glu Asn Ala
 130 135 140
 35 Glu Arg Leu Met Asp Asp Asn Asp Ser Glu Asn Asn Gln Glu Ser Met
 145 150 155 160
 Pro Ser Leu Ser Phe Arg Gln Thr Met Trp Arg Ala Phe Glu Asn Pro
 165 170 175
 40 His Thr Ser Thr Leu Ala Leu Val Phe Tyr Tyr Val Thr Gly Phe Phe
 180 185 190
 45 Ile Ala Val Ser Val Ile Thr Asn Val Val Glu Thr Val Pro Cys Gly
 195 200 205
 Thr Val Pro Gly Ser Lys Glu Leu Pro Cys Gly Glu Arg Tyr Ser Val
 210 215 220
 50 Ala Phe Phe Cys Leu Asp Thr Ala Cys Val Met Ile Phe Thr Gly Glu
 225 230 235 240
 Tyr Leu Leu Arg Leu Phe Ala Ala Pro Ser Arg Tyr Arg Phe Ile Arg
 245 250 255
 55 Ser Val Met Ser Ile Ile Asp Val Val Ala Ile Met Pro Tyr Tyr Ile
 260 265 270
 60 Gly Leu Val Met Thr Asn Asn Glu Asp Val Ser Gly Ala Phe Val Thr
 275 280 285

65

DE 199 63 612 A 1

Leu Arg Val Phe Arg Val Phe Arg Ile Phe Lys Phe Ser Arg His Ser	
290 295 300	
Gln Gly Leu Arg Ile Leu Gly Tyr Thr Leu Lys Ser Cys Ala Ser Glu	5
305 310 315 320	
Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ser Leu Thr Met Ala Ile Ile Ile Ph Ala	
325 330 335	
Thr Val Met Phe Tyr Ala Glu Lys Gly Ser Ser Ala Ser Lys Phe Thr	10
340 345 350	
Ser Ile Pro Ala Ser Phe Trp Tyr Thr Ile Val Thr Met Thr Thr Leu	
355 360 365	
Gly Tyr Gly Asp Met Val Leu Lys Thr Ile Ala Gly Lys Ile Phe Gly	15
370 375 380	
Ser Ile Cys Ser Leu Ser Gly Val Leu Val Ile Ala Leu Pro Val Pro	20
385 390 395 400	
Val Ile Val Ser Asn Phe Ser Arg Ile Tyr His Gln Asn Gln Arg Ala	
405 410 415	
Asp Lys Arg Arg Ala Gln Lys Lys Ala Arg Leu Ala Arg Ile Arg Val	25
420 425 430	
Ala Lys Thr Gly Ser Ser Asn Ala Tyr Leu His Ser Lys Arg Asn Gly	
435 440 445	
Leu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Thr Gly Thr Pro Glu Glu Glu His	30
450 455 460	
Met Gly Lys Thr Thr Ser Leu Ile Glu Ser Gln His His His Leu Leu	
465 470 475 480	
His Cys Leu Glu Lys Thr Thr Gly Leu Ser Tyr Leu Val Asp Asp Pro	35
485 490 495	
Leu Leu Ser Val Arg Thr Ser Thr Ile Lys Asn His Glu Phe Ile Asp	40
500 505 510	
Glu Gln Met Phe Glu Gln Asn Cys Met Glu Ser Ser Met Gln Asn Tyr	
515 520 525	
Pro Ser Thr Arg Ser Pro Ser Leu Ser Ser His Pro Gly Leu Thr Thr	45
530 535 540	
Thr Cys Cys Ser Arg Arg Ser Lys Lys Thr Thr His Leu Pro Asn Ser	
545 550 555 560	
Asn Leu Pro Ala Thr Arg Leu Arg Ser Met Gln Glu Leu Ser Thr Ile	50
565 570 575	
His Ile Gln Gly Ser Glu Gln Pro Ser Leu Thr Thr Ser Arg Ser Ser	
580 585 590	
Leu Asn Leu Lys Ala Asp Asp Gly Leu Arg Pro Asn Cys Lys Thr Ser	55
595 600 605	
Gln Ile Thr Thr Ala Ile Ile Ser Ile Pro Thr Pro Pro Ala Leu Thr	60
610 615 620	
Pro Glu Gly Glu Ser Arg Pro Pro Pro Ala Ser Pro Gly Pro Asn Thr	
625 630 635 640	
Asn Ile Pro Ser Il Thr Ser Asn Val Val Lys Val Ser Ala Leu	65
645 650 655	

1. Kaliumkanalprotein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Kv4.1 ist, das die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.
2. Kaliumkanalprotein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Kv4.2 ist, das die in SEQ ID NO: 4 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.
3. Kaliumkanalprotein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es ein Homologes, ein Derivat oder ein Fragment des Kaliumkanalproteins nach Anspruch 1 oder 2 ist, das die gleiche elektrobiologische, pharmakologische und/oder biologische Wirkung und/oder Immunogenität aufweist.
4. Kaliumkanal, **dadurch gekennzeichnet**, daß er aus vier Untereinheiten besteht, die aus der Gruppe bestehend aus den Kaliumkanalproteinen Kv4.1 (SEQ ID NO: 2), Kv4.2 (SEQ ID NO: 4), Kv4.3 (SEQ ID NO: 29) sowie Homologen, Derivaten oder Fragmenten derselben, die die gleiche elektrobiologische, pharmakologische und/oder biologische Wirkung und/oder Immunogenität aufweisen, ausgewählt sind.
5. Kaliumkanal nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß er die Kaliumkanalproteine Kv4.1 und Kv4.2 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 4 : 0, 3 : 1, 2 : 2, 1 : 3 oder 0 : 4 enthält.
6. Kaliumkanal nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß er die Kaliumkanalproteine Kv4.1 und Kv4.3 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 4 : 0, 3 : 1, 2 : 2, 1 : 3 oder 0 : 4 enthält.
7. Kaliumkanal nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß er die Kaliumkanalproteine Kv4.2 und Kv4.3 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 4 : 0, 3 : 1, 2 : 2, 1 : 3 oder 0 : 4 enthält.
8. Kaliumkanal nach den Ansprüchen 4 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein spannungsabhängiger Kaliumkanal ist.
9. Nukleinsäuresequenz, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie für ein Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 3 kodiert.
10. Nukleinsäuresequenz, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie für einen Kaliumkanal nach den Ansprüchen 4 bis 8 kodiert.
11. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus der Gruppe bestehend aus
 - (a) der in SEQ ID NO: 1 angegebenen Nukleotidsequenz,
 - (b) der in SEQ ID NO: 3 angegebenen Nukleotidsequenz,
 - (c) syngenen oder komplementären Sequenzen der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3, soweit sie für ein Protein mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren, und
 - (d) allelischen Varianten und Fragmenten der Sequenzen gemäß (a) bis (c), soweit sie für ein Protein mit gleicher elektrophysiologischer, pharmakologischer und/oder biologischer Wirksamkeit und/oder Immunogenität kodieren,
 ausgewählt ist.
12. Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 9 bis 11 enthält.
13. Vektor, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mehrere Nukleinsäuresequenzen nach den Ansprüchen 9 bis 11 enthält.
14. Vektor nach Anspruch 12 oder 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein Expressionsvektor ist.
15. Vektor nach Anspruch 14 mit der Hinterlegungsnummer DSM 13 222, der eine für Kv4.1 (SEQ ID NO: 1) kodierende Nukleinsäuresequenz enthält.
16. Vektor nach Anspruch 14 mit der Hinterlegungsnummer DSM 13 221, der eine für Kv4.2 (SEQ ID NO: 3) kodierende Nukleinsäuresequenz enthält.
17. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Vektor nach den Ansprüchen 14 bis 16 transformiert ist.
18. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit mehreren Vektoren nach den Ansprüchen 14 bis 16 transformiert ist, wobei die Vektoren voneinander abweichende Nukleinsäuresequenzen enthalten.
19. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Vektoren enthält, die für die Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.1 (SEQ ID NO: 2) und Kv4.2 (SEQ ID NO: 4) oder für Homologe, Derivate oder Fragmente derselben kodieren.
20. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Vektoren enthält, die für die Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.1 (SEQ ID NO: 2) und Kv4.3 (SEQ ID NO: 29) oder für Homologe, Derivate oder Fragmente derselben kodieren.
21. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie Vektoren enthält, die für die Kaliumkanaluntereinheiten Kv4.2 (SEQ ID NO: 4) und Kv4.3 (SEQ ID NO: 29) oder für Homologe, Derivate oder Fragmente derselben kodieren.
22. Wirtszelle nach den Ansprüchen 17 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine CHO-Zelle ist.
23. Wirtszelle nach den Ansprüchen 17 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie ein *Xenopus* Oozyt ist.
24. Wirtszelle nach den Ansprüchen 17 bis 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie den durch die Vektoren kodierten Kaliumkanal funktionell exprimiert.
25. Wirtszelle nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie den durch die Vektoren kodierten Kaliumkanal auf ihrer Oberfläche exprimiert.
26. Verfahren zur Expression eines Kaliumkanals, **dadurch gekennzeichnet**, daß man eine eukaryontische Wirtszelle nach den Ansprüchen 17 bis 25 unter Bedingungen kultiviert, die zur Expression des Kaliumkanals geeignet sind.
27. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - (a) an Wirtszellen nach den Ansprüchen 17 bis 25 den Kaliumauswärtstrom mißt,
 - (b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
 - (c) an Wirtszellen erneut den Kaliumauswärtstrom mißt,
 wobei der Unterschied zwischen dem Kaliumauswärtstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß man den Kaliumauswärtsstrom mit Hilfe der "patch-clamp"-Methode bestimmt.
29. Verfahren nach den Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine öffnende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz keine Kaliumauswärtsströme fließen, Kaliumauswärtsströme fließen.
30. Verfahren nach den Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine aktivierende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom verstärkt wird.
31. Verfahren nach den Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine schließende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz bei einem Membranpotential, bei dem ohne Zugabe der Substanz Kaliumauswärtsströme fließen, keine Kaliumauswärtsströme fließen.
32. Verfahren nach den Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine inaktivierende Substanz ist, wenn nach Zugabe der Substanz ein bereits vorhandener Kaliumauswärtsstrom vermindert wird, ohne daß der Kaliumauswärtsstrom vollständig zum Erliegen kommt.
33. Verfahren nach den Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine verändernde Substanz ist, wenn durch Zugabe der Substanz biophysikalische Eigenschaften des Kaliumkanals wie Spannungsabhängigkeit, Leitfähigkeit, Aktivierungszeitkonstanten, Inaktivierungszeitkonstanten, Schaltverhalten, Offenzeiten oder Geschlossenzeiten verändert werden.
34. Verfahren nach den Ansprüchen 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß eine Substanz eine verändernde Substanz ist, wenn durch Zugabe der Substanz die Zelloberflächenexpression des Kaliumkanals verändert wird.
35. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, dadurch gekennzeichnet, daß man
- (a) an Wirtszellen nach den Ansprüchen 17 bis 25 das Membranpotential mißt,
 - (b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
 - (c) an Wirtszellen erneut das Membranpotential mißt,
- wobei der Unterschied zwischen dem Membranpotential vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.
36. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Kaliumkanäle zu öffnen, zu schließen, zu aktivieren, zu inaktivieren oder in ihren biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, bei dem man
- (a) an den erfindungsgemäßen Wirtszellen das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom mißt,
 - (b) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
 - (c) das Membranpotential und den Kaliumauswärtsstrom erneut mißt,
- wobei die Unterschiede zwischen dem Membranpotential und dem Kaliumauswärtsstrom vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmen.
37. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die Proteinkinasen aktivieren, bei dem man
- (a) in den erfindungsgemäßen Wirtszellen, die exprimierten Kv4-Kaliumkanäle phosphoryliert,
 - (b) die Amplitude der durch Kv4-Kanäle vermittelten transienten Auswärtsströme mißt,
 - (c) die Wirtszellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
 - (d) die Amplitude der durch Kv4-Kanäle vermittelten transienten Auswärtsströme erneut mißt,
- wobei die Substanz eine Proteinkinase aktivierende Substanz ist, wenn sich die in (b) und (d) gemessene Amplitude durch Zugabe der Substanz verändert.
38. Antikörper, der an das isolierte Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 3 bindet.
39. Antikörper, der an das Kaliumkanalprotein nach den Ansprüchen 1 bis 3 bindet, wobei das Kaliumkanalprotein Bestandteil eines Kaliumkanals nach den Ansprüchen 4 bis 8 ist.
40. Antikörper nach Anspruch 38 oder 39, dadurch gekennzeichnet, daß er ein polyklonaler Antikörper ist.
41. Antikörper nach Anspruch 38 oder 39, dadurch gekennzeichnet, daß er ein monoklonaler Antikörper ist.

Ilterzu 15 Seite(n) Zeichnungen

Kv4.1

CTCCTAAACG	CCACCCTCAC	TAAGTCTCCC	TGGGCTTGGG	GAGTGGCACG	50
ATGGCGGCAG	GCCTGGCCAC	GTGGCTGCCT	TTTGCTCGGG	CAGCAGCAGT	100
GGGCTGGCTG	CCCCTGGCCC	AGCAACCCCT	GCCCCCGGCA	CCGGGGGTGA	150
AGGCATCTCG	AGGAGATGAG	GTTCTGGTGG	TGAACGTGAG	CGGACGGCGC	200
TTTGAGACTT	GGAAGAATAC	GCTGGACCGC	TACCCAGACA	CCTTGCTGGG	250
CAGCTCGGAG	AAGGAATTCT	TCTACGATGC	TGACTCAGGC	GAGTACTTCT	300
TCGATCGCGA	CCCTGACATG	TTCCGCCATG	TGCTGAACTT	CTACCGAACG	350
GGGCGGCTGC	ATTGCCCCACG	GCAGGAGTGC	ATCCAGGCCT	TCGACGAAGA	400
GCTGGCTTTC	TACGGCCTGG	TTCCCAGACT	AGTCGGTGAC	TGCTGCCTTG	450
AAGAGTATCG	GGACCGAAAG	AAGGAGAATG	CCGAGCGCCT	GGCAGAGGAT	500
GAGGAGGCAG	AGCAGGCCGG	GGACGGCCCA	GCCCTGCCAG	CAGGCAGCTC	550
CCTGCGGCAG	CGGCTCTGGC	GGGCCTTCGA	GAATCCACAC	ACGAGCACCG	600
CAGCCCTCGT	TTTCTACTAT	GTGACCGGCT	TCTTCATCGC	CGTGTCGGTC	650
ATCGCCAATG	TGGTGGAGAC	CATCCCATGC	CGCGGCTCTG	CACGCAGGTC	700
CTCAAGGGAG	CAGCCCTGTG	GCGAACGCTT	CCCACAGGCC	TTTTTCTGCA	750
TGGACACAGC	CTGTGTACTC	ATATTACAG	GTGAATACCT	CCTGCGGCTG	800
TTTGCCGCCC	CCAGCCGTTG	CCGCTTCCTG	CGGAGTGTCA	TGAGCCTCAT	850
CGACGTGGTG	GCCATCCTGC	CCTACTACAT	TGGGCTTTTG	GTGCCCCAAGA	900
ACGACGATGT	CTCTGGCGCC	TTTGTCACCC	TGCGTGTGTT	CCGGGTGTTT	950
CGCATCTTCA	AGTTCTCCAG	GCACTCACAG	GGCTTGAGGA	TTCTGGGCTA	1000
CACACTCAAG	AGCTGTGCCT	CTGAGCTGGG	CTTTCTCCTC	TTTTCCCTAA	1050
CCATGGCCAT	CATCATCTTT	GCCACTGTCA	TGTTTTATGC	TGAGAAGGGC	1100
ACAAACAAGA	CCAACTTTAC	AAGCATCCCT	GCGGCCTTCT	GGTATACCAT	1150
TGTCACCATG	ACCACGCTTG	GCTACGGAGA	CATGGTGGCC	AGCACCATTG	1200
CTGGCAAGAT	TTTCGGGTCC	ATCTGCTCAC	TCAGTGGCGT	CTTGGTCAAT	1250
GCCCTGCCTG	TGCCAGTCAT	TGTGTCCAAC	TTAGCCGCA	TCTACCACCA	1300
GAACCAGCGG	GCTGACAAGC	GCCGAGCACA	GCAGAAGGTG	CGCTTGCCAA	1350
GGATCCGGTT	GGCAAAGAGT	GGTACCACCA	ATGCCTTCCT	GCAGTACAAG	1400
CAGAAATGGGG	GCCTTGAGGA	CAGCGGCAGT	GGCGAGGAAC	AGGCTCTTTG	1450
TGTCAGGAAC	CGTTCTGCCT	TTGAACAGCA	ACATCACCAC	TTGCTGCACT	1500
GTCTAGAGAA	GACAACGTGC	CATGAGTTCA	CAGATGAGCT	CACCTTCAGT	1550
GAAGCCCTGG	GAGCCGTCTC	GCCGGGTGGC	CGCACCAGCC	GTAGCACCTC	1600
TGTGTCTTCC	CAGCCAGTGG	GACCCGGAAG	CCTGCTGTCT	TCTTGCTGCC	1650
CTCGCAGGGC	CAAGCGCCGC	GCCATCCGCC	TGCCAACTC	CACTGCCTCA	1700
GTCAGCCGTG	GCAGCATGCA	GGAGCTGGAC	ATGCTGGCAG	GGCTGCGCAG	1750
GAGCCATGCC	CCTCAGAGCC	GCTCCAGCCT	CAATGCCAAG	CCCCATGACA	1800
GCCTTGACCT	GAAGTGCAG	AGCCGGGACT	TCGTGGCTGC	CATTATCAGC	1850
ATCCCTACCC	CTCCTGCCAA	CACCCAGAT	GAGAGCCAAC	CTTCCTCCCC	1900
TGGCGGCGGT	GGCAGGGCCG	GCAGCACCTT	CAGGAACCTC	AGCCTGGGTA	1950
CCCTTGCCCT	CTTCCCCGAG	ACTGTCAAGA	TCTCATCCCT	GTGAGGGGTA	2000
GGCCTGCTGA	TTCAAGAGGT	CCTCTTCATT	TTTGGGAAT	CCTTTCCAAA	2050
GCCATATTTT	TGGGAGGCAG	AGAGGGGCAG	GCTTGGGCAC	CCCTTCTGCC	2100
CCCCCCTACTG	AGAACTATGC	AATGGAGTTT	CATGAAATGG	TCCACATAGT	2150
GGGGAAGTAG	CCAGGAAATG	AGAACTTCC	TCCCACCCCA	GACATTTTTT	2200
CTGGTGGGAG	CTGAAGCACT	GGGCTTCCAC	AGGCCCCCTG	CCTCCTTGCC	2250
CTAGCACACT	GGGACTGGCC	CCACTCTCCC	AGCTGGACTC	CTGCATGCTC	2300
CTCCCCCTTG	GCTCTCAGAT	GAAGGCAAAG	CTTGATCCG	ACATCTGAGC	2350
TCTAGCCTAA	GAAGGAGAGT	TGAGATTTC	TCCTCCCTCT	GGCTGGGATA	2400
TGGAGCTTTG	GAGGTTTACA	GAAGAGAACC	CTCACCTCTG	ATCTGGCCTC	2450
TACGAGAGGT	CCTCATCTCC	ATCTGGCCCA	ACAATTCCCA	GATTCTGAAG	2500
CTTGGAATGC	AAACACAGGC	TTTATGGGCT	GTGGCCTCTG	CAGCGACCTG	2550
CCATCCCCAG	GCCTTGCCCTG	AGGGGTCAGG	CTGCCTCTCC	CAACACACAC	2600
TCAGATAGCA	CAAATTCTAC	CATCCCCCTC	CCTGGCTGCT	GGAAAT	2646

Figur 1A

hK_v4.1 MAAGLATWLPFARAAAVGWLPPLAQQLPPAPGVKASRGDEVLVVNVSGRRFETWKNTLDR 60

hK_v4.1 YPDTLLGSSEKEFFYDADSGEYFFDRDPDMFRHVLNFRYRTGRHLCHCPRQECIQAFDEELAF 120

hK_v4.1 YGLVPELVGDCCLLEEYDRKKENAERLAEDDEAEQAGDGPALPAGSSLRQLRWRAFENPH 180

hK_v4.1 TSTAALVFYYVTGFFIAVSVIANVETIPCRGSARRSREQPCGERFPQAFFCMDTACVL 240

hK_v4.1 IFTGEYLLRLFAAPSRRCRFLRSVMSLIDVVAILPYYIGLLVPKNDDVSGAFVTLRVFRVF 300

hK_v4.1 RIFKFSRHSQGLRILGYTLKSCASELGFLFSLTMAIIIFATVMFYAEKGTNKTFTSIP 360

hK_v4.1 AAFWYTIVTMTTLGYGDMVPSTIAGKIFGSLSGVLVIALPVPVIVSNFVSRIYHQNR 420

hK_v4.1 ADKRRQQKVRLARIRLAKSGTTNAFLQYKQNGGLEDSGSGEQALCVNRNSAFEQQHH 480

hK_v4.1 LLHCLEKTCHEFTDELTFSEALGAVSPGGRTSRSTSVSSQVPGPSLLSSCCPRRAKRR 540

hK_v4.1 AIRLANSTASVSRGSMQELDMLAGLRRSHAPQSRSSLNAKPHDSLNLNCDSDRDFVAAIIS 600

hK_v4.1 IPTPPANTPDESQSPSPGGGGRAGSTLRNSSLGTPLFPETVKISSL

Figur 1B

Kv4.2

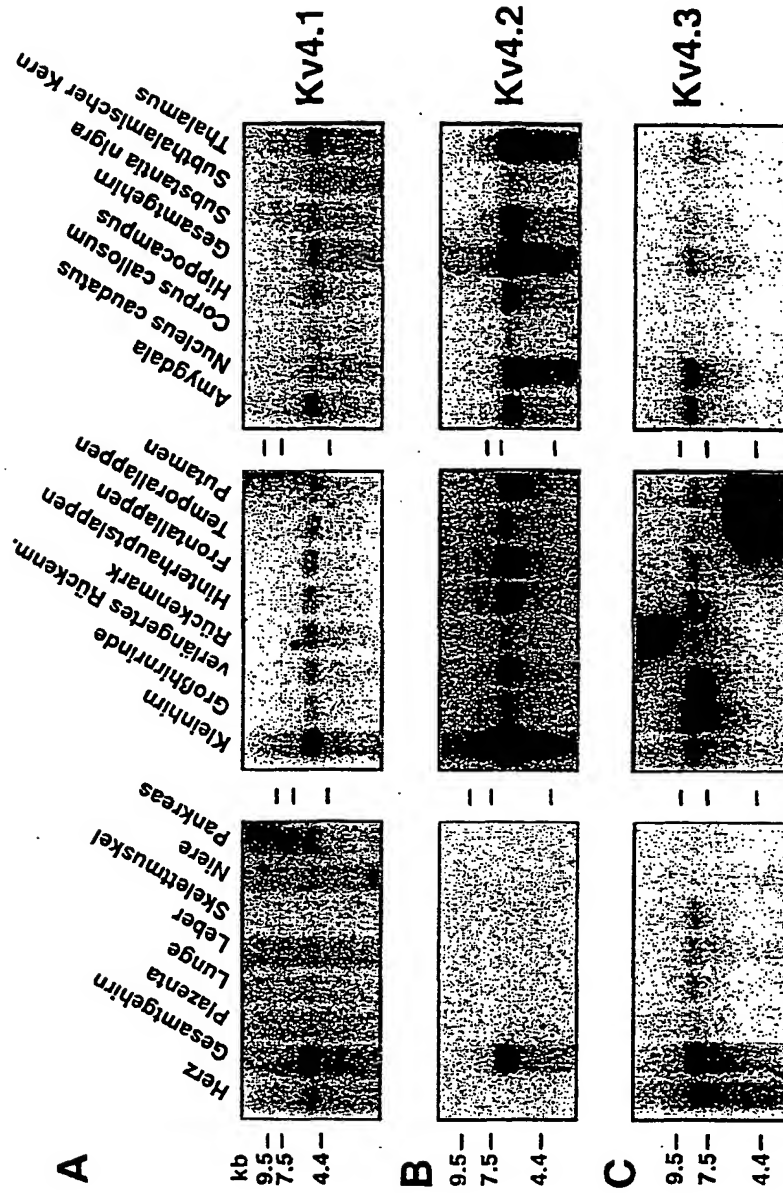
GAATTCTATT	GGGTGACTCT	CGTTCGTCTT	CTCTATCCTA	CACTCCACAT	50
ACTGACCCTA	TATTATCCAG	ACTGTGCCGG	GGAGAAATCA	AAAACACCTG	100
TTTGAAGAAA	CGGCTGCACC	TGTGTGCTTA	TTTGTGCCAG	AGGGTGGCCT	150
AGCCACCTG	CAGGAAGAGA	TTTGGCTGGG	TTCTGTTGAG	GGTGATTGTT	200
AGGACGTTGT	ATTTTGTTCG	CATTATTCCA	AATACCTGTC	TTGGAGGGAA	250
AGTTGCCCTT	CTGAGAACTG	TGACTTTACC	AGGAGCCCTA	TCTTGGAATA	300
AGAGTTACAC	CTCTGGACCA	CGTTTCTCAC	TAGTACTTTG	CTTGACTGGA	350
GGAAGTGGGT	GACTTTTGGC	TGCTTCGGTG	ACCCATTGTA	GACGCCTCGT	400
TACCCTTCTT	CCTTCCGCTT	CAAGTAATCA	TGGCGGCGGG	GGTGGCAGCG	450
TGGCTGCCTT	TTGCAAGGGC	AGCGGCTATC	GGGTGGATGC	CTGTGGCCTC	500
GGGGCCTATG	CCGGCTCCCC	CGAGGCAGGA	GAGGAAAAGG	ACCCAAGATG	550
CTCTCATTGT	GCTGAATGTG	AGTGGCACCC	GCTTCCAGAC	GTGGCAGGAC	600
ACCCTGGAAC	GTTACCCAGA	CACTCTACTG	GGCAGTTCCTG	AGAGGGACTT	650
TTTCTACCAC	CCAGAACTC	AGCAGTATTT	CTTTGACCGT	GACCCAGACA	700
TCTTCCGCCA	CATCCTGAAT	TTCTACCGCA	CTGGGAAGCT	CCACTATCCT	750
CGCCACGAGT	GCATCTCTGC	TTACGATGAA	GAAGTGGCCT	TCTTTGGCCT	800
CATCCCGGAA	ATCATCGGCG	ACTGCTGTTA	TGAGGAGTAC	AAGGATCGCA	850
GGCGAGAGAA	CGCCGAGCGC	CTGCAGGACG	ACGCGGATAC	CGACACCGCT	900
GGGGAGAGCG	CCTTGCCAC	CATGACTGCA	AGGCAGAGGG	TCTGGAGGGC	950
CTTCGAGAAC	CCCCACACCA	GCACGATGGC	CCTGGTGTTT	TACTATGTCA	1000
CGGGGTTTTT	CATTGCCGTC	TCTGTCTATC	CGAATGTGGT	GGAAACAGTG	1050
CCGTGCGGAT	CAAGCCCAGG	TCACATTAAA	GAAGTGGCCT	GTGGAGAGCG	1100
GTATGCTGTG	GCCTTCTTCT	GCTTGACAC	GGCCTGCGTC	ATGATCTTCA	1150
CAGTTGAGTA	TTTGCTTCGC	CTGGCTGCAG	CGCCTAGTCG	TTACCGTTTT	1200
GTGCGTAGTG	TCATGAGTAT	CATCGACGTG	GTGGCCATCC	TGCCATTATTA	1250
CATTGGGCTG	GTGATGACAG	ACAATGAGGA	CGTCAGCGGA	GCCTTTGTCA	1300
CACTCCGAGT	CTTCCGGGTC	TTCAGGATCT	TTAAGTTTTT	CCGCCACTCT	1350
CAAGGCCTGC	GCATCCTGGG	GTACACACTG	AAGAGTTGTG	CCTCAGAATT	1400
GGGCTTCTTG	CTTTTCTCGC	TCACCATGGC	TATCATCATC	TTCCGTACAG	1450
TTATGTTCTA	CGCAGAGAAG	GGGTCTTCGG	CTAGCAAGTT	CACCAGCATC	1500
CCTGCAGCCT	TCTGGTATAC	CATCGTCACC	ATGACAACAC	TAGGGTATGG	1550
TGACATGGTG	CCAAAAACCA	TAGCAGGGAA	GATTTTTTGGT	TCTATCTGTT	1600
CGCTGAGTGG	GGTCTTGGTC	ATTGCTCTAC	CTGTTCCGGT	GATTGTATCC	1650
AACCTCAGTC	GCATCTACCA	CCAGAATCAA	CGAGCAGACA	AACGAAGGGC	1700
ACAAAAGAAA	GCTAGACTGG	CCAGGATCCG	GGCAGCCAAA	AGCGGAAGCG	1750
CAAAATGCTTA	CATGCAGAGC	AAACGGAATG	GTTTACTCAG	TAATCAGCTG	1800
CAGTCCTCAG	AGGATGAGCA	GGCTTTTGTT	AGCAAATCCG	GCTCCAGCTT	1850
TGAAACCCAG	CACCACCACC	TGCTTCACTG	CCTGGAAAAA	ACCACGAATC	1900
ACGAGTTTGT	GGACGAACAA	GTCTTTGAAG	AAAGCTGCAT	GGAAGTTGCA	1950
ACTGTTAATC	GTCTTTCAAG	TCACAGTCCT	TCACTGTCTT	CACAACAAGG	2000
AGTCACCAGC	ACCTGCTGTT	CACGACGACA	CAAAAAAACT	TTTCGCATCC	2050
CAAAATGCCAA	TGTATCAGGA	AGCCATCAAG	GTAAGTATACA	AGAACTCAGC	2100
ACGATTTCAGA	TCAGATGTGT	GGAGAGAACA	CCTCTGTCTA	ACAGCCGATC	2150
CAGTTTAAAT	GCCAAAATGG	AAGAGTGTGT	TAACTAAAC	TGTGAACAAC	2200
CTTATGTGAC	TACAGCAATA	ATAAGCATCC	CAACACCTCC	AGTAACCACA	2250
CCAGAAGGAG	ACGATAGGCC	AGAATCCCCT	GAGTACTCAG	GAGGAAATAT	2300
TGTCAGAGTT	TCTGCTTTGT	AAGACAATTG	GAATAAGGTC	TAAGAGAATT	2350
C					2351

Figur 2A

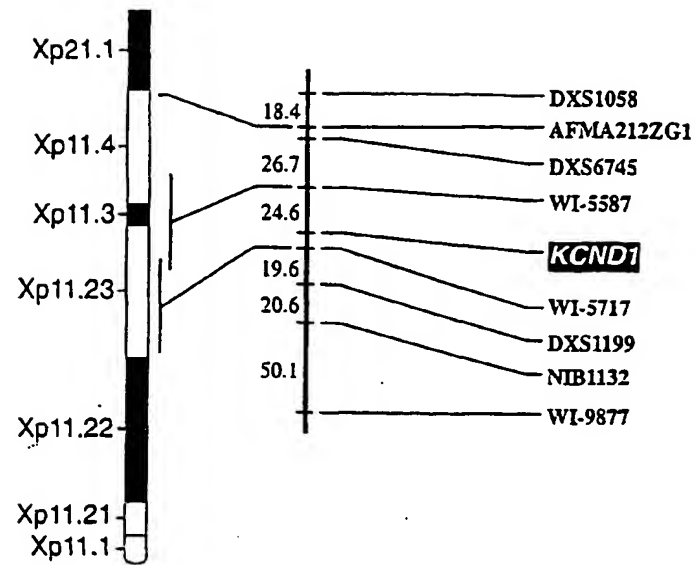
hKv4.2 MAAGVAANLWPFARAAAIGWMPFVSGMPAPPQERKRTQDALLVINVSGTRFQTDQDTLE 60
hKv4.2 RYPDTLLGSSERDFFYHPETQQYFFDRDPDIFRHLNPFYRTGKHLHYPRHECISAYDEELA 120
hKv4.2 FFGLIPEIIGDCCYEYKDRRRENAERLQDDADTDTAGESALPTMTARQVRWAFENPHT 180
hKv4.2 STMALVFFYYVTGFFIAVSVIANVTVPCGSSPGHKEPCGERYAVAFFCLDTACVMIP 240
hKv4.2 TVEYLLRLAAAPSRVRFVRSVMSIIDVVAILPYYIGLVMTDNEVDVGAFVTLRVFRVRI 300
hKv4.2 FKFSRHSQGLRILGYTLKSCASELGFLFSLTMAIIFATVMFYAEKGSASKFTSIPAA 360
hKv4.2 FWTIVTMTLGYGDVPRKTIAGKIFGSICSLSGVLVIALPVPVIVSNFSRIYHQNRAD 420
hKv4.2 KRRAQKARLARIRAAKSGSANAYMQSKRNGLLSNQLQSSDEDEQAFVSKSGSFETQHHH 480
hKv4.2 LLHCLEKTINHEFVDEQVFEESCMEVATVNRPSHSPSLSSQQGVSTCCSRRHKKTFR 540
hKv4.2 PNANVSGSHQSGIQELSTIQINCVERTPLNSRSSLNARMEECVKLNCEQPYVTTAIIISI 600
hKv4.2 PTPPVTTPEGDDRRPEPEYSGGNIVRVSA 630

Figur 2B

hKv4.1	MAAGLAWLPFARAAAGWLPFAQQPLFAAGVFAASGDEVLVV-NVSGRREPTWENTLD	59
hKv4.2	MAAGVAAWLPFARAAAGWMPVASCNPFAPFOERKRAQDALIVLVNSGTRFQWQDTLE	60
hKv4.3L	MAAGVAAWLPFARAAAGWMPVANCPHFLAPADFNKR-QDELLIVLVNSGTRFQWQDTLE	59
hKv4.1	RYPDTLLGSSSEKEFFYDADSCEYFFDRDPDPRHVLNFYRTGRLHCPRCECTQAEDEELA	119
hKv4.2	RYPDTLLGSSSRDFFVEPETQCYFFDRDPDPRHVLNFYRTGRLHYPREECISAYDEELA	120
hKv4.3L	RYPDTLLGSSSEKEFFENEDTKEYFFDRDPDPRHVLNFYRTGRLHYPREECISAYDEELA	119
hKv4.1	FYGLVPELVGDCCLEFYDRDRKRENAERLADDEAEQACDGFALPAGSSERORWRAFENF	179
hKv4.2	FEGLVPELVGDCCVEEYKDRRRENAERLQDDADDTAGES-ALPT-MTARORWRAFENF	178
hKv4.3L	FYGLVPELVGDCCVEEYKDRKRENAERLQDDADSENNOES--MFS-LSFRQWRAFENF	176
hKv4.1	HTSTALVFFYYVTGFFIAVSVIANVVEVTPC-GSARRSSREOPCGEREPQAFECMDTACV	239
hKv4.2	HTSTALVFFYYVTGFFIAVSVIANVVEVTPC-GSSPGHKLPCGERVAVAFFCLDTACV	237
hKv4.3L	HTSTALVFFYYVTGFFIAVSVIANVVEVTPC-GTVEGS-KELPCGERVAVAFFCLDTACV	234
hKv4.1	LIFTCEYLLRLFAAPSRORFERSVMSIIDVAILPYYIGLVTKNDDVSGAFVTLRVFRV	299
hKv4.2	MIFTVEYLLRLFAAPSRYRFERSVMSIIDVAILPYYIGLVMTNEDVSGAFVTLRVFRV	297
hKv4.3L	MIFTVEYLLRLFAAPSRYRFERSVMSIIDVAILPYYIGLVMTNEDVSGAFVTLRVFRV	294
hKv4.1	FRIFKFSRHSQGLRILGYTLKSCASELGFLFSLTMAIIFATVMFYAERGLNKVFTSI	359
hKv4.2	FRIFKFSRHSQGLRILGYTLKSCASELGFLFSLTMAIIFATVMFYAERGSSASKFTSI	357
hKv4.3L	FRIFKFSRHSQGLRILGYTLKSCASELGFLFSLTMAIIFATVMFYAERGSSASKFTSI	354
hKv4.1	PAAFWYTIVTMTTLGYGDMVPESTIAGKIFGSICSLSGVLVIALPVPVIVSNFSRIYHONQ	419
hKv4.2	PAAFWYTIVTMTTLGYGDMVPKTIAGKIFGSICSLSGVLVIALPVPVIVSNFSRIYHONQ	417
hKv4.3L	PASFYTIVTMTTLGYGDMVPKTIAGKIFGSICSLSGVLVIALPVPVIVSNFSRIYHONQ	414
hKv4.1	RADKRRACQKRLARIRAKSGTANAELOMKONGLEDSS--GSGEQALCVNRNSAFBQ	476
hKv4.2	RADKRRACQKRLARIRAKSGSANAYMQSKRNGLLSNQIQ--SSEDEQAFVSKGSSSEF	476
hKv4.3L	RADKRRACQKRLARIRAKTGSANAYLESKRNGLLNEAGELTGTFEEHMKRTSTIES	474
hKv4.1	QHHHLLHCLEKTT-----CHEFDDELTFSEA-LGAVSPGGRTSRST	516
hKv4.2	QHHHLLHCLEKTT-----NHEFYDEQVEEESCMVEVATVNFSSHSP	517
hKv4.3L	QHHHLLHCLEKTTGLSYLVDDPLLSVRTSTLNHEFYDEQVEEONCMSSMONPSTRSP	534
hKv4.1	SVSSQFVGPGSLSSCCPERRAKRRARIRANSTASVSR-GSMQELDMTA--GERFSEHAPCS	573
hKv4.2	SLSSQF----GVTSACCSRRRKK--TFRIPNAVSGSHQGSTQELSTIQTRCVETPLSNS	572
hKv4.3L	SLSSQF----GLTTCCSRRSKK--TTELPSNMGPAIRLRSMQELSTIETQSEQPSLITS	589
hKv4.1	RSSLNARPHDSLDLNOESRDFVAIIISITPPANTPDESQSSPGCCGACSTLRNSSLG	633
hKv4.2	RSSLNARMEECVKNCEQPYVTTAIIISITPPVITPE-----GDDREPSPEYS----	620
hKv4.3L	RSSLNARMEEDGLRNCVTSQVTTAIIISITPPAITPE-----GSRPPASPAPGNTN	641
hKv4.1	TECFPPETVKISSL	647
hKv4.2	---GGNVVRSAL	630
hKv4.3L	IPSTASNVKVSAL	655



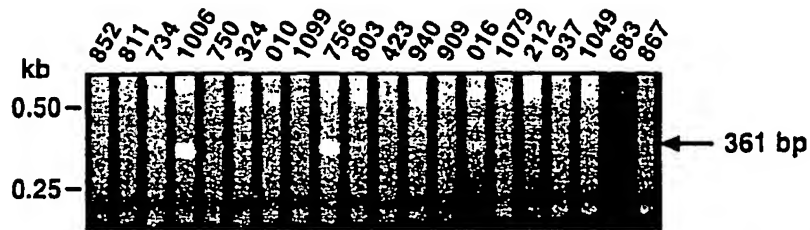
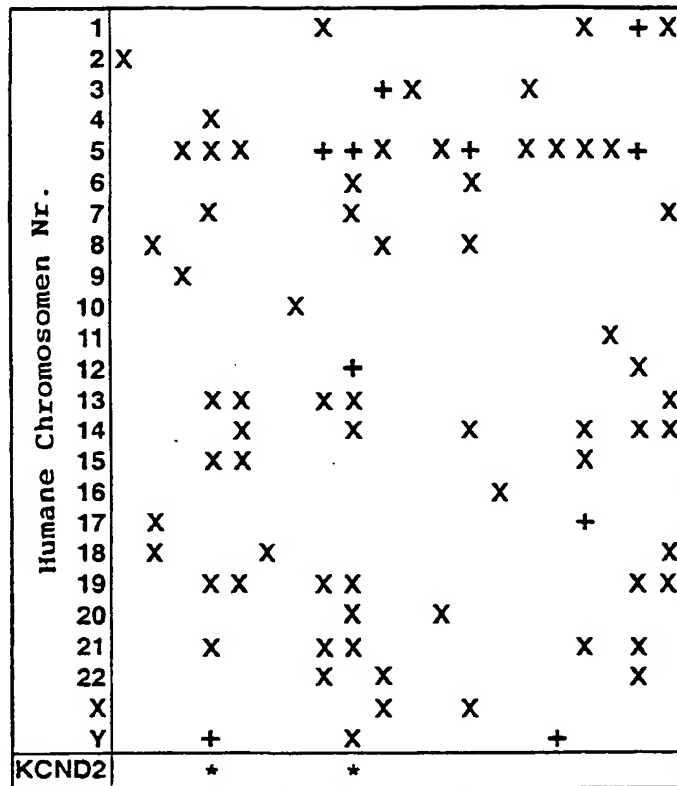
Figur 3



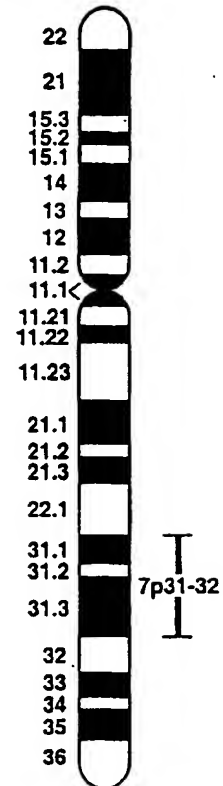
Figur 4

Hybrid DNA Zelllinien

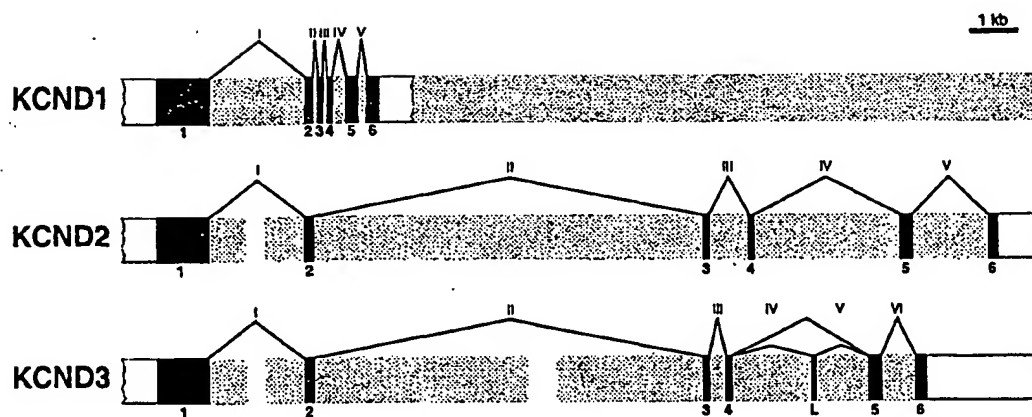
A

**B**

C



Figur 5



Figur 6

A

tggatgcccc	agtctcctct	ccaccactgc	aaaggaattc	caggctcttc	50
tgccttcctt	gaagactctt	gagagtgcag	agaattcccc	aggtgtttct	100
tggccccctt	agacgcccc	agacacctct	caggcacagg	ctgactcctt	150
tagaatcatc	tcagtctctc	taaaccctcc	ctcagctcct	tcttggcccc	200
atccccacac	cccttttctg	ctcttctcca	tgtccccaag	gcccttctca	250
gtccctcaga	acattgcccc	ggccctcctt	aggttctgta	aatgtccccc	300
agactccttc	ccatctcttt	agttcttctt	cctggttcct	cttggcctct	350
ctagacaccc	ccagtttctt	tgtttgggtg	gctcaagggtg	tctccaagcc	400
cccaccatcc	tggagacagc	cacattctcc	taaacgccac	cctcactaag	450
tctccctggg	cttggggagt	ggcacgATGG	CGGCAGGCTT	GGCCACGTGG	500
CTGCCTTTTG	CTCGGGCAGC	AGCAGTGGGC	TGGCTGCCCC	TGGCCCAGCA	550
ACCCCTGCCC	CCGGCACC GG	GGGTGAAGGC	ATCTCGAGGA	GATGAGGTTT	600
TGGTGGTGAA	CGTGAGCGGA	CGGCGCTTTG	AGACTTGGA	GAATACGCTG	650
GACCGCTACC	CAGACACCTT	GCTGGGCAGC	TCGGAGAAGG	AATTCTTCTA	700
CGATGCTGAC	TCAGGCGAGT	ACTTCTTCGA	TCGCGACCCT	GACATGTTCC	750
GCCATGTGCT	GAACCTCTAC	CGAACGGGGC	GGCTGCATTG	CCCACGGCAG	800
GAGTGCATCC	AGGCCTTCGA	CGAAGAGCTG	GCTTTCTACG	GCCTGGTTCC	850
CGAGCTAGTC	GGTGA CTGCT	GCCTTGAAGA	GTATCGGGAC	CGAAAGAAGG	900
AGAATGCCGA	GCGCCTGGCA	GAGGATGAGG	AGGCAGAGCA	GGCCGGGGAC	950
GGCCAGCCC	TGCCAGCAGG	CAGCTCCCTG	CGGCAGCGGC	TCTGGCGGGC	1000
CTTCGAGAAT	CCACACACGA	GCACCGCAGC	CCTCGTTTTT	TACTATGTGA	1050
CCGGCTTCTT	CATCGCCGTG	TCGGTCATCG	CCAATGTGGT	GGAGACCATC	1100
CCATGCCGCG	GCTCTGCACG	CAGGTCCTCA	AGGGAGCAGC	CCTGTGGCGA	1150
ACGCTTCCCA	CAGGCCTTTT	TCTGCATGGA	CACAGCCTGT	GTACTCATAT	1200
TCACAGGTGA	ATACCTCCTG	CGGCTGTTTG	CCGCCCCCAG	CCGTGCGCGC	1250
TTCCTGCGGA	GTGTCATGAG	CCTCATCGAC	GTGGTGCCCA	TCCTGCCCTA	1300
CTACATTGGG	CTTTTGGTGC	CCAAGAACGA	CGATGTCTCT	GGCGCCTTTG	1350
TCACCCTGCG	TGTGTTCCGG	GTGTTTCGCA	TCTTCAAGTT	CTCCAGGCAC	1400
TCACAGGGCT	TGAGGATTCT	GGGCTACACA	CTCAAGAGCT	GTGCCTCTGA	1450
GCTGGGCTTT	CTCCTCTTTT	CCCTAACCAT	GGCCATCATC	ATCTTTGCCA	1500
CTGTCATGTT	TTATGCTGAG	AAGGGCACAA	ACAAGACCAA	CTTTACAAGC	1550
ATCCCTGCGG	CCTTCTGGTA	TACCATTGTC	ACCATGACCA	CGCTTGGgtg	1600
agtgtggact	ctgcgttggg	ggctgccccg	ttacactcac	cctttctgta	1650
aaattaggaa	gtttaaagga	atgatctctt	tctttctttc	tttttaaagt	1700
gagtcttact	ctgtcgcdca	ggctggagta	cagtggcaag	atctcagctc	1750
actacaacct	ctgcttcctg	ggttcaagtg	attctccagc	ctcagactcc	1800
caagtagctg	ggattacagg	tacacgccac	catgcccagc	taatttttgt	1850
atttttagta	gagacggggg	ttcacgcgct	tggccaggct	ggtctcaaac	1900
tcctgacctc	aggtgatccg	ccgcttgggc	gcaaagtgc	cgggattaca	1950
gggtgagacc	accgcgcctg	gctcttctct	ttgagctcag	ttgctcatct	2000
sacaactgag	agctgactat	ctcagatcct	cag		2033

Figur 7A

B

```

taggcaggcc attctcactt gcccaccagc catttttacag agcaagaaac 50
tgagggactc agaaggtttg agtgccctggc cagggtcaca gagctagtcc 100
ggattagatg ggatggagtg ggggactgaa aggtaggtgg gcacttttcc 150
tgaccttggc ctacctcccc tcgctccagC TACGGAGACA TGGTGCCAG 200
CACCATTGCT GGCAAGATTT TCGGGTCCAT CTGCTCACTC AGTGGCGTCT 250
TGGTCATTGC CCTGCCTGTG CCAGTCATTG TGTCCAACCT TAGCCGCATC 300
TACCACCAGA ACCAGCGGGC TGACAAGCGC CGAGCACAGC AGgtaaccgc 350
actttccatc cgagcacctc ctactcccca caccccaagc cagtctactt 400
tggggcttac ccacctgacc ttttatctcc tctctctgca gAAGGTGCGC 450
TTGGCAAGGA TCCGATTGGC AAAGAGTGGT ACCACCAATG CCTTCCTGCA 500
GTACAAGCAG AATGGGGGCC TTGAGgtggg tcggggcctg gatagggttg 550
gggtgagcca taacggggag gaaggtgctg cccttatcgc tctgctccat 600
ctactccagG ACAGCGGCAG TGGCGAGGAA CAGGCTCTTT GTGTCAGGAA 650
CCGTCTGCC TTTGAACAGC AACATCACCA CTTGCTGCAC TGTCTAGAGA 700
AGACAACGgt gaggcctaata gtgaggtgat atagcagaat agaggggggtc 750
cctctgcggc catgccagct ctctcccttg gatgggaggc tcactacaaa 800
ttgtggaaat cacacagagc ttcctggaag aggctacagg agagccaagc 850
cttgaagaat gggcaaggga aggggaagagg gaacaatgtc cagaaaggag 900
aaaacagcct gagcaaaggc ttgagggtgg gatcagctcc catgggatgc 950
cccgtgacct tgcctccctt ctgcatagT GCCATGAGTT CACAGATGAG 1000
CTCACCTTCA GTGAAGCCCT GGGAGCCGTC TCGCCGGGTG GCCGCACCAG 1050
CCGTAGCACC TCTGTGTCTT CCCAGCCAGT GGGACCCGGA AGCCTGCTGT 1100
CTTCTTGCTG CCCTCGCAGG GCCAAGCGCC GCGCCATCCG CCTTGCCAAAC 1150
TCCACTGCCT CAGTCAGCCG TGGCAGCATG CAGGAGCTGG ACATGCTGGC 1200
AGGGCTGCGC AGGAGCCATG CCCCTCAGAG gtaagcagcc ctcctacctg 1250
ctagccacac ctgggggaagc tcagagctta gaccagtagc tctgagattt 1300
cataactcca ggcctagcaa gtcaagctcg aacccaaacc cctccatgct 1350
ggatgcttgg gcttatcttg tctggaactc attcttcac cattcttttt 1400

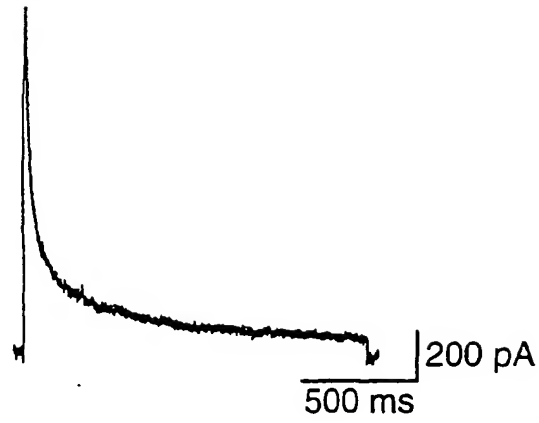
```

Figur 7B

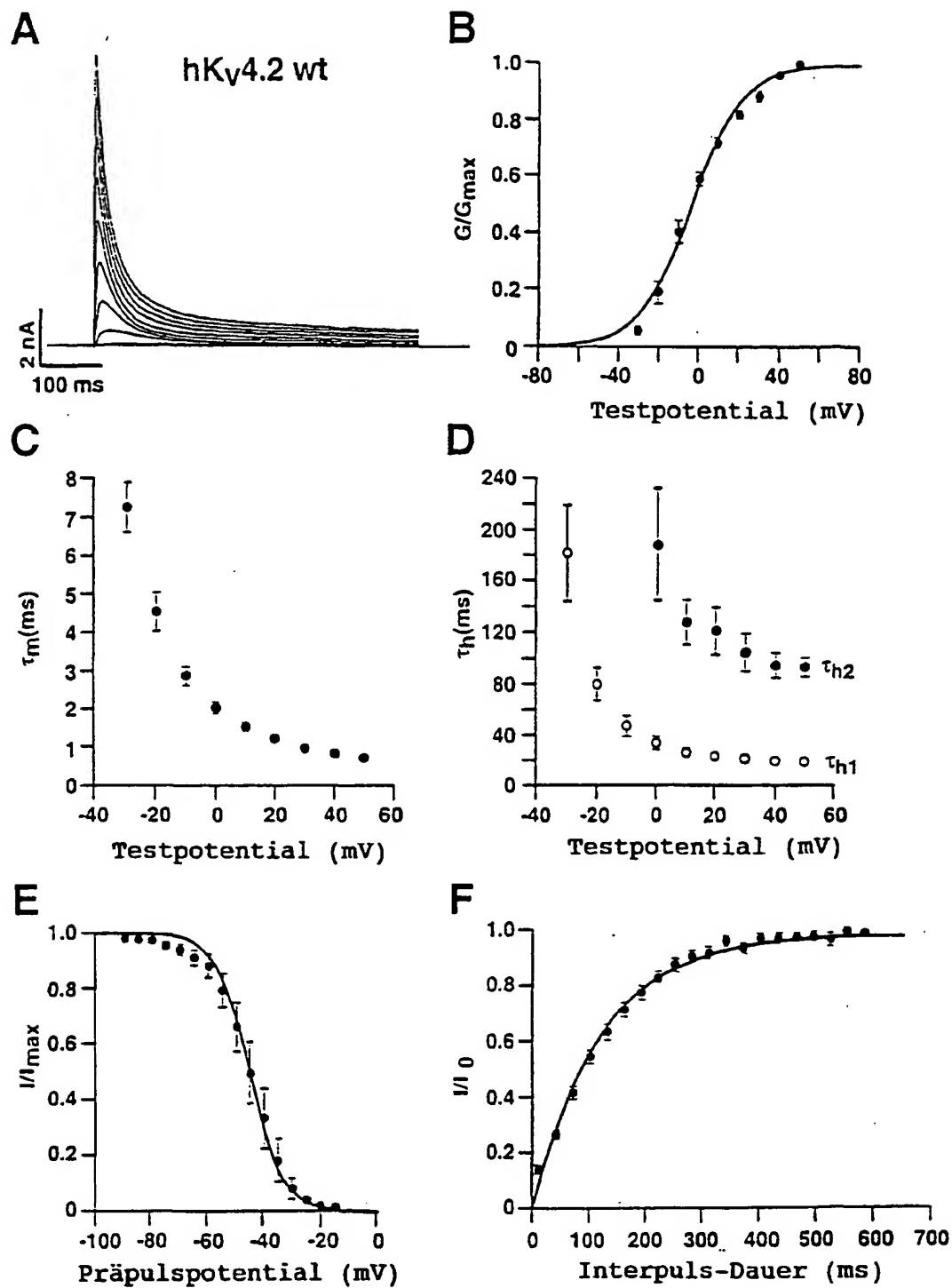
C

```
ctggtattac aggcacacac caccacgccc agctaattgt tgtatTTTTa 50
gtagagatga ggttttgcca tgttacccag gctagtctcg aactcctgac 100
ctcagatgat ccactcacct cggcctccca aagtgctggg attacaggca 150
tgagccaccg caccggcct aagataactt ttttaagagcc tcccatcttc 200
tccacccttg tccacagCCG CTCCAGCCTC AATGCCAAGC CCCATGACAG 250
CCTTGACCTG AACTGCGACA GCCGGGACTT CGTGGCTGCC ATTATCAGCA 300
TCCCTACCCC TCCTGCCAAC ACCCCAGATG AGAGCCAACC TCCTCCCCT 350
GGCGGCGGTG GCAGGGCCGG CAGCACCTC AGGAACTCCA GCCTGGGTAC 400
CCCTTGCCCTC TTCCCCGAGA CTGTCAAGAT CTCATCCCTG TGAggggtag 450
gcctgctgat tcagaggggc ctcttcattt ttgggaactc ctttccaaag 500
ccatattttt gggaggcaga gaggggcag 529
```

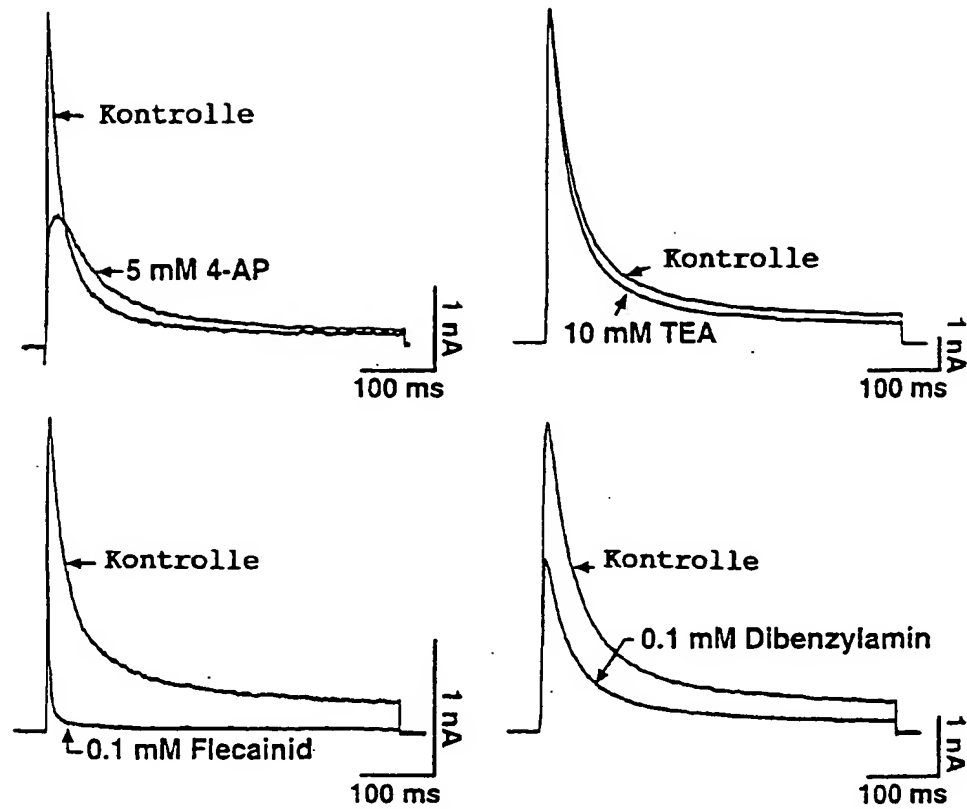
Figur 7C



Figur 8



Figur 9



Figur 10

New potassium channel subunit proteins, useful for identifying and testing potential pharmaceuticals, e.g. anti-arrhythmic or neurological agents

Patent Number: DE19963612

Publication date: 2001-07-12

Inventor(s):

Applicant(s): FORSCHUNGSGESELLSCHAFT GENION (DE)

Requested Patent: ☐ DE19963612

Application Number: DE19991063612 19991229

Priority Number(s): DE19991063612 19991229

IPC Classification: C07K14/435; C07K16/18; A61K38/17; A61K39/395

EC Classification: C07K14/705

Equivalents:

Abstract

A potassium channel protein (I) that is either human Kv4.1 or Kv4.2 with a fully defined sequence of 646 or 629 amino acids (aa) as given in the specification, is new. Independent claims are also included for the following: (a) a homolog, derivative or fragment of (I) with the same electrophysiological, pharmacological and/or biological activities, and/or immunogenicity; (b) potassium channels (A) comprising four subunits, i.e. Kv4.1, 4.2 and/or 4.3 with a fully defined sequence of 655 aa as given in the specification, or the homologs, derivatives or fragments of (a); (c) nucleic acid sequences (II) that encode (I) or (A); (d) a vector containing at least one (II); (e) a host cell transformed with at least one vector of (d); (f) expressing a potassium channel by culturing eukaryotic cells of (e); (g) identifying and testing substances (X) that can open, close, or (in)activate potassium channels, or alter their biophysical properties; (h) identifying and testing compounds (Y) that activate protein kinases; and (i) an antibody (Ab) that binds to (I) or to channels that contain it.

Data supplied from the esp@cenet database - I2